



Universitat de Lleida
Doble grau de Veterinària i Ciència i Producció Animal

INMUNOCONTRACEPCIÓN EN ESPECIES SALVAJES



EL FUTURO DE LOS MÉTODOS ANTICONCEPTIVOS

MARIA NEBREDÁ MARTÍNEZ

Maria Nebreda Martínez

Trabajo de final de grado de Veterinaria

Tutora: Irene López Helguera

Índice

Abreviaciones y acrónimos.....	1
Resumen.....	2
Abstract	3
Introducción	4
Objetivos.....	6
Material y métodos.....	7
Diseño.....	7
Estrategia de búsqueda.....	7
Criterios de inclusión y exclusión	7
Extracción de datos	8
Resultados y discusión.....	9
Métodos anticonceptivos actuales	9
¿Qué es la inmuncontracepción?.....	10
Vacunas anti-ZP	15
Vacuna PZP	15
Vacunas basadas en otras ZP.....	19
Vacuna anti-GnRH	20
Inmuncontracepción con el tracto masculino como diana	23
Eppin	24
Conclusiones	25
Bibliografía y webgrafía	26
Anexo 1.....	36
Anexo 2.....	36
Métodos anticonceptivos	36
Cirugía	36
Métodos mecánicos.....	37
Hormonales	38

Índice de tablas

Tabla 1. Listado de vacunas comerciales basadas en la PZP y sus aplicaciones	18
Tabla 2. Listado de vacunas comerciales basadas en la anti-GnRH y sus aplicaciones.....	23
Tabla 3. Estrategia de búsqueda	39

Índice de ilustraciones

Imagen 1. Gráfica representativa de los documentos publicados en cada año desde 2014 con la estrategia de búsqueda <i>TITLE-ABS-KEY (immunocontraception AND wildlife)</i>	8
Imagen 2. Representación simplificada del eje HPG del macho y sus feedbacks reproductivos. En gris vemos los receptores y los órganos dónde se sintetizan las hormonas. En recuadros azules vemos las hormonas reproductivas. En flechas verdes se puede observar los feedbacks positivos (estimulación) y en flechas rojas los feedbacks negativos (inhibición)	12
Imagen 3. Representación del eje HPG en una hembra dependiendo de la fase estral en la que se encuentre (amarillo). En gris vemos los receptores y los órganos dónde se sintetizan las hormonas. En recuadros azules vemos las hormonas reproductivas. En flechas verdes se puede observar los feedbacks positivos (estimulación) y en flechas rojas los feedbacks negativos (inhibición)	1
Imagen 4. Vista general de los objetivos de la inmuncontracepción	15
Imagen 5. Vacuna PZP; unión espermatozoos con sus receptores de la ZP con y sin anticuerpos	17
Imagen 6. Mecanismo de la GnRH; normal y con inhibición por anticuerpos anti-GnRH	22

Abreviaciones y acrónimos

IUCN → Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

IUD → dispositivo intrauterino

GnRH → Hormona Liberadora de Gonadotropinas

FSH → Hormona Estimulante de Folículos

LH → Hormona Luteinizante

P4 → Progesterona

ZP → Zona Pelúcida

PZP → Zona Pelúcida Porcina

FMA → Adyuvante Modificado de Freud

IFA → Adyuvante Incompleto de Freud

FCA → Adyuvante Completo de Freud

TB → Tuberculosis

EPPIN → Epididimal Proteasa Inhibitor

KHL → proteína azul del molusco

GNRF → Factor Liberador de Gonadotropinas

PCR → Reacción en Cadena de la Polimerasa

ARNm → Acido Ribonucleico mensajero

Ig → inmunoglobulina

MPA → Acetato de Medroxiprogesterona

MGA → Acetato de Melengestrol

Resumen

A medida que la población humana crece, los conflictos con la fauna salvaje aumentan. Al mismo tiempo, las preocupaciones sobre los métodos letales convencionales de gestión de fauna restringen las opciones disponibles para la mitigación de conflictos. Paralelamente, existe un interés creciente en utilizar el control de fertilidad para gestionar la vida silvestre. La inmunosupresión es un método anticonceptivo innovador que proporciona infertilidad a largo plazo. Este método anticonceptivo actúa activando el sistema inmunitario y creando anticuerpos contra proteínas y moléculas del propio cuerpo. Actualmente, las dos vacunas anticonceptivas más utilizadas en animales salvajes y de zoológico son la vacuna anti-GnRH y la vacuna PZP, aunque existen otras técnicas para alcanzar la infertilidad mediante la inmunosupresión. Las dos especies en las que más frecuentemente se aplican estos métodos son el caballo semi-salvaje en Estados Unidos y los elefantes en África, donde los conflictos humanos-fauna están muy presentes. Esta revisión tiene como objetivo analizar las técnicas de inmunosupresión como control de la fertilidad de la vida silvestre y revisar las especies y la efectividad de los diferentes métodos inmunosupresivos.

Palabras clave → conflicto humanos-fauna salvaje, métodos letales, contracepción, inmunosupresión, vacuna PZP, vacuna anti-GnRH

Abstract

As the human population grows, conflicts with wildlife increase. At the same time, the concern about conventional lethal methods of management this wildlife, restrict the options available for conflict mitigation. Nowadays, a growing interest exists infertility control to manage wildlife population. Immunocontraception is an innovative contraceptive method that provides long-term infertility. This method works activating the immune system and creating antibodies against proteins and molecules of the body itself. Currently, the two most commonly used contraceptive vaccines in wild and zoo animals are the GnRH and the PZP vaccine, although there are other techniques to achieve infertility by immunocontraception. The two species in which these methods are most frequently applied are the feral horse in the United States and the elephants in Africa, where human-wildlife conflicts are commonly present. The purpose of this review was to analyze immunocontraception methods, analyzing the species in which each technique is applied and the effectiveness of the practice.

Keywords→ human-wildlife conflicts, lethal methods, contraception, immunocontraception, PZP vaccine, anti-GnRH vaccine

Introducción

La interacción hombre-fauna salvaje se ha visto aumentada por el exponencial crecimiento de la raza humana a lo largo de todo el planeta y hace que el control de la población de animales salvajes sea uno de los mayores retos de manejo de este tipo de fauna. Las actividades humanas y la destrucción de espacios naturales está forzando a los animales a entrar en zonas urbanas y agrícolas, causando conflictos tales como el riesgo de zoonosis, accidentes de tráfico, daños en las cosechas y en vías públicas⁶. Un ejemplo de ello es la interacción caballos semi-salvajes y burros con el hombre en Estados Unidos. De manera natural el número de animales no debería sobrepasar los 27.000 individuos, siendo en la actualidad más de 75.000 animales sumando las dos especies⁷. Otro caso es el que describe Choudhury (2004) respecto a los elefantes en el noreste de la India, donde entre 1980 y 2003, más de 1,150 humanos y 370 elefantes murieron como resultado de conflictos entre las dos especies⁸. Los humanos han tratado de controlar la abundancia animal desde hace más de 13.000 años². Una opción es mediante el control de la fertilidad o la anticoncepción, un desarrollo relativamente nuevo que surgió hace tan solo 50 años³. Estas herramientas son atractivas ya que presentan una solución no letal para regular la abundancia cuando las especies representan un riesgo para los intereses humanos y los ecosistemas^{4,5}.

Una de las tareas más difíciles a la hora de poner en marcha un plan para el control de la fertilidad es tener en cuenta el estado de vulnerabilidad de las especies en que aplicamos este plan. La IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) tiene una lista de todas las especies y su grado de amenaza (Lista roja). Siempre se debe tener en cuenta con que especie tratamos y en qué lugar lo hacemos (si está protegido o no)⁹. Un ejemplo claro es el elefante africano (*Loxodonta africana*), clasificado por la IUCN como especie vulnerable (alta probabilidad de convertirse en especie en peligro de extinción). No es lo mismo aplicar este plan a elefantes africanos en Sudáfrica donde las poblaciones están creciendo y provocando un conflicto humanos-vida salvaje, que aplicarlo en una zona donde el elefante está desapareciendo y en vías de la extinción.

Como alternativa a los métodos letales usados hasta el momento, se propone la contracepción como técnica de control de estas poblaciones. La contracepción es una prevención deliberada de la concepción o la implantación embrionaria. El término se utiliza normalmente para referirnos a la prevención de la gestación en mamíferos, incluido el hombre. El objetivo de la contracepción es el control de la reproducción del individuo, pero también se usa para reducir o estabilizar el tamaño poblacional³. Hay muchos enfoques para afrontar este reto

biotecnológico. La gestación en mamíferos resulta de la fertilización interna, así que el método más simple de contracepción es separar a los machos y a las hembras, prevenir el contacto del esperma con el óvulo por métodos mecánicos como el diafragma o los preservativos. También se pueden usar procedimientos quirúrgicos para poner barreras y que los gametos no lleguen a su destino, esto se puede conseguir tanto por vasectomía o como por ligamento de oviductos¹⁰. El mismo efecto se consigue cuando se retiran por métodos quirúrgicos los ovarios y/o el útero (ovariectomía o ovariosterectomía) o los testículos en caso de machos (orquiectomía o castración). Otros métodos anticonceptivos previenen la ovulación suprimiendo la función ovárica (ej. Implantes hormonales, contraceptivos orales), o cuando la fertilización ya ha ocurrido hay métodos que previenen la implantación (IUDs u objeto intrauterino)¹⁰. Todas las opciones tienen sus limitaciones prácticas y sus implicaciones éticas.

Recientemente, técnicas de inmunización han conseguido unos resultados prometedores como método anticonceptivo. La inmunoontracepción es un método que utiliza los anticuerpos creados bien contra la Zona Pelúcida (ZP) o contra los receptores de GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) para evitar la concepción¹². Esta respuesta inmune se puede usar para interferir en la función espermática del macho, en los ciclos hormonales de la hembra o en la fertilización¹¹. Una de las ventajas generales de los inmunoontraceptivos es la falta de riesgos adversos para la salud de los animales a los que va dirigido¹³. El alto grado de eficacia, la reversibilidad, el mínimo número de inyecciones, la larga duración y el coste asequible son otras de las ventajas que proporciona esta técnica¹³. Los métodos irreversibles, por ejemplo, nos proporcionan un alto grado de eficacia, pero sin la oportunidad de revertir el proceso y siempre se realiza bajo una anestesia, lo que pone en riesgo la vida del animal. En cuanto a los métodos reversibles, ninguno es tan duradero con tan pocas inoculaciones, es decir, los otros métodos en los que se incluyen progestágenos y agonistas de la hormona GnRH, son métodos menos eficaces y prácticos en animales con un manejo más restringido.

Esta revisión pretende dar una visión global de cómo funciona esta innovadora técnica para controlar la reproducción en mamíferos salvajes y las ventajas y desventajas que tiene cada uno de los métodos de inmunoontracepción. Se revisará la eficacia de la inmunoontracepción según las publicaciones actuales y se analizará su uso frente a técnicas más tradicionales de control reproductivo.

Objetivos

El objetivo de este trabajo es analizar el papel que juega la inmunocontracepción en el control de la fauna silvestre, revisando las especies en las que se aplica cada técnica y su efectividad. También se valorarán las ventajas y las desventajas de la inmunocontracepción como método anticonceptivo en comparación con los métodos tradicionales.

Material y métodos

Diseño

Se ha realizado una revisión sistemática de estudios científicos extraídos de SCOPUS, PubMed y Google Scholar que hablan sobre la inmuncontracepción, específicamente la aplicación de este método en animales salvajes y de zoológico. También se han revisado documentos como libros para completar la información.

Estrategia de búsqueda

En primer lugar, se llevó a cabo una búsqueda general sobre artículos e información relacionados con la inmuncontracepción en animales en google scholar. Posteriormente, se realizó una búsqueda de documentos y artículos en la página científica de SCOPUS con diferentes ecuaciones de búsqueda, combinando “immunocontraception” con “wildlife”, “mechanism of action”, “GnRH”, “porcine zona pelucida”, “rabbit zona pellucida” y cada especie de interés mediante los operadores booleanos AND (tabla en el anexo 1).

Una vez realizada la búsqueda en las páginas webs científicas se analizaron libros y referencias bibliográficas con el fin de rescatar otros artículos o documentos potencialmente incluíbles para la revisión bibliográfica.

Criterios de inclusión y exclusión

En la búsqueda de artículos, se decidieron incluir todos aquellos que estuvieran comprendidos en los años 2014-2019 tanto en inglés como en español. Otro criterio de inclusión fue seleccionar todos los artículos que hablan de especies de animales salvajes o de zoológico, incluyendo todos aquellos de animales domésticos o humana que explicaran el mecanismo de acción del método anticonceptivo. Se incluyeron aquellos artículos que pese a ser más antiguos del 2014 fueran necesarios para ampliar la revisión por falta de estudios modernos del tema, estos artículos incluyen especies de las que artículos contemporáneos no hablan y revisiones para respaldar los artículos de los 5 últimos años.

El principal criterio de exclusión fue que los artículos hablan o sacaran conclusiones sobre la especie humana y especies animales que no fueran salvajes o de zoológico. Se incluyeron artículos sobre el mecanismo de acción en otras especies. También se descartaron artículos que

estuvieran en algún idioma que no fuera inglés o español. Los artículos que no sacaran conclusiones claras o no las redactaran correctamente también fueron excluidos de la revisión.

Extracción de datos

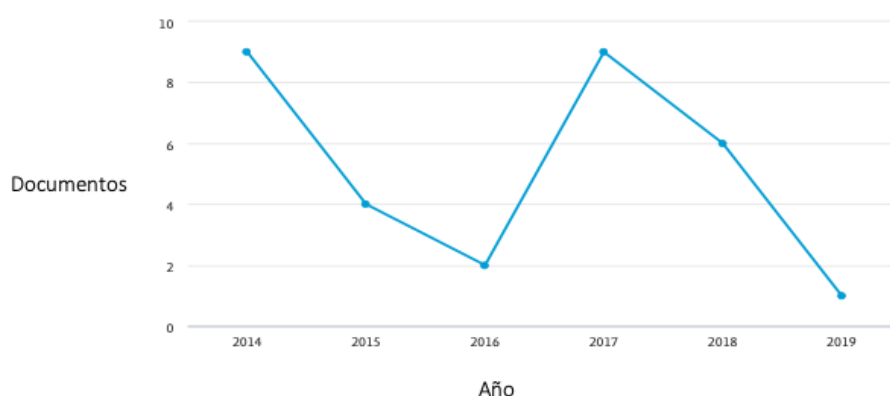


Imagen 1. Gráfica representativa de los documentos publicados en cada año desde 2014 con la estrategia de búsqueda *TITLE-ABS-KEY (immunocontraception AND wildlife)*.

Tras la búsqueda inicial en SCOPUS se encontraron 124 artículos que trataban sobre inmunización en animales salvajes, los cuales se redujeron a 30 después de aplicar los criterios de inclusión y exclusión anteriormente explicados. 93 artículos se descartaron por ser más antiguos de lo establecido y 1 se descartó por hablar del gato doméstico.

En la imagen 1 podemos ver los 30 documentos y sus años de publicación, siendo el 2014 y 2017 los que más publicaciones tienen.

En búsquedas más acotadas, 8 artículos de 42 fueron seleccionados en la búsqueda de la técnica de PZP en inmunización de animales salvajes. Todos los artículos que se descartaron fueron por el año en el que se escribieron.

Para valorar la eficacia de cada método se obtuvo la información de la posible gestación durante el tratamiento, comportamiento de estro, atracción hacia el macho o hacia la hembra y efectos secundarios notables. Se considera efectos secundarios notables aquellos que ponen en riesgo la vida del animal o la reducción de la ingesta diaria en más del 50% de los animales del estudio.

Resultados y discusión

Métodos anticonceptivos actuales

El control de la fertilidad ya sea por vía quirúrgica, química e inmunológica, es una alternativa viable a los métodos letales para el control de la población. En lo que se refiere a métodos reversibles, hace 40 años empezaron a aparecer los primeros anticonceptivos en forma de pastilla que combinaban los progestágenos y los estrógenos para conseguir la contracepción. Los progestágenos inyectables aparecieron más tarde siendo una innovación y un gran avance para la contracepción en animales, sobretodo en la vida salvaje. La teoría de la inmunización, recientemente, ha conseguido unos resultados prometedores como método anticonceptivo en un rango amplio de especies. Estas técnicas usan vacunas para engañar al propio cuerpo y que rechace algunas moléculas esenciales para la reproducción. Esta respuesta inmune se puede usar para interferir en la función espermática, en los ciclos hormonales de la hembra o en la fertilización.

Los *progestágenos* son una serie de hormonas sintéticas que imitan la actividad de la progesterona (P4), esta actividad consiste en una retroalimentación negativa sobre las gonadotropinas y la GnRH, inhibiendo el desarrollo folicular y la ovulación. Existe una gran variedad de progestágenos según su principio activo y su marca comercial. La *GnRH*, es una hormona hipotalámica que regula la reproducción. Es la encargada de la liberación de hormona luteinizante (LH) y de la hormona foliculoestimulante (FSH), cuya tarea es la ovulación y el crecimiento de folículos, respectivamente¹⁴, un tratamiento a largo plazo con agonistas de GnRH previene la ovulación, disminuyendo los receptores de la hormona en la glándula pituitaria, impidiendo así, que se libere la cantidad necesaria de FSH y LH para el funcionamiento del ovario¹⁵. La *inmunocostracepción* es un método que utiliza los anticuerpos creados contra la zona Pelúcida o contra los receptores de GnRH para evitar la concepción.

Entre los aspectos que debemos considerar al escoger un método contraceptivo se encuentran la especie a la que se quiere aplicar el protocolo anticonceptivo, eficacia y seguridad del propio método, factores económicos, la vía de administración, efectos ambientales (si son animales en libertad) y la aceptación social entre muchos otros.

¿Qué es la inmuncontracepción?

La inmuncontracepción describe la prevención de la fertilización tanto por el bloqueo de la liberación del espermatozoides o del óvulo, como de su interacción en el tracto reproductivo femenino. En contraste con las vacunas contra enfermedades infecciosas, las vacunas anti-fertilidad inducen respuestas inmunológicas (anticuerpos y respuesta celular) contra moléculas propias del individuo. Entre estas moléculas se incluyen proteínas o químicos involucrados en la producción de gametos o esteroides sexuales, liberación de óvulos y espermatozoides viables, fertilización, implantación y su consiguiente desarrollo embrionario.

Este método se considera un método reversible pues al cesar el tratamiento se restablece la función reproductiva inicial y la aplicación del protocolo no debería afectar a las hormonas sexuales circulantes, a la libido o al carácter del animal en ningún aspecto. Pero dado que las vacunas anti-fertilidad están diseñadas para romper la tolerancia inmunitaria a antígenos propios siempre hay un riesgo de inducir una enfermedad autoinmune a largo plazo. Por lo tanto, estas vacunas, deberían seleccionar los antígenos diana cuidadosamente para evitar el riesgo de reacciones cruzadas y evitar así interacciones innecesarias con otros procesos fisiológicos.

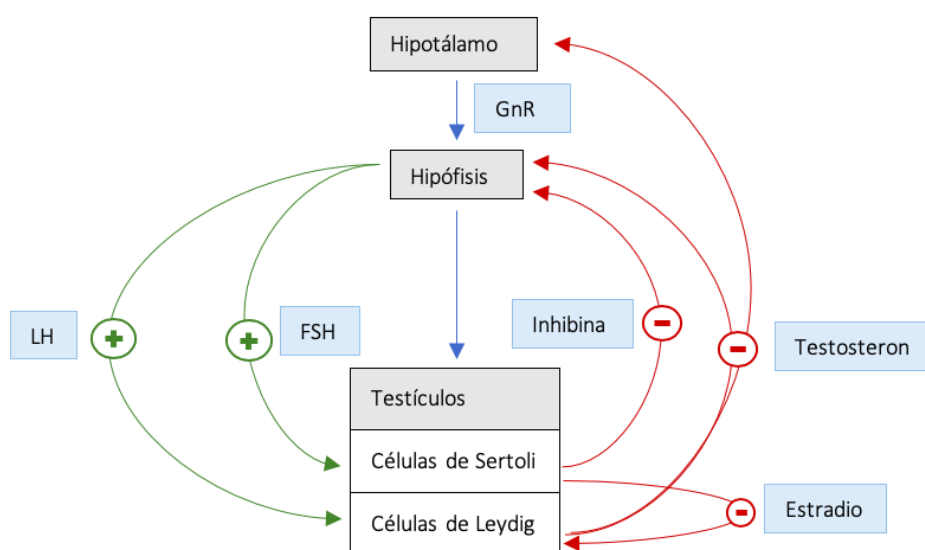


Imagen 2. Representación simplificada del eje HPG del macho y sus feedbacks reproductivos. En gris vemos los receptores y los órganos donde se sintetizan las hormonas. En recuadros azules vemos las hormonas reproductivas. En flechas verdes se puede observar los feedbacks positivos (estimulación) y en flechas rojas los feedbacks negativos (inhibición).

Fuente: adaptado de Rosenfield y Pizzuto (2018)

El mayor reto en entender la fisiología reproductiva de los animales salvajes es la diversidad de especies. Tan solo de la clase de mamíferos, se conocen más de 5.500 especies cada una con sus particularidades anatómicas y biológicas. En términos generales, el eje hipotálamo-pituitario-gonadal es el eje en el que se basa toda la reproducción, aunque los tres

órganos están totalmente diferenciados, trabajan juntos y dependen unos de otros. El hipotálamo regula muchas funciones homeostáticas y responde a influencias ambientales (estímulos como feromonas), lleva a cabo muchos procesos fisiológicos y comportamentales. La glándula pituitaria se divide en dos lóbulos, la adenohipófisis y la neurohipófisis (dividida en anterior y posterior). Se encarga de secretar la FSH y LH en la adenohipófisis, esta secreción la regula la GnRH secretada por el hipotálamo. Como podemos ver en la imagen 2, la GnRH regula la liberación de LH y FSH que van directamente a las gónadas, mientras que estas liberan hormonas como la inhibina y la testosterona que ejercen de reguladores para la GnRH inhibiendo su producción.

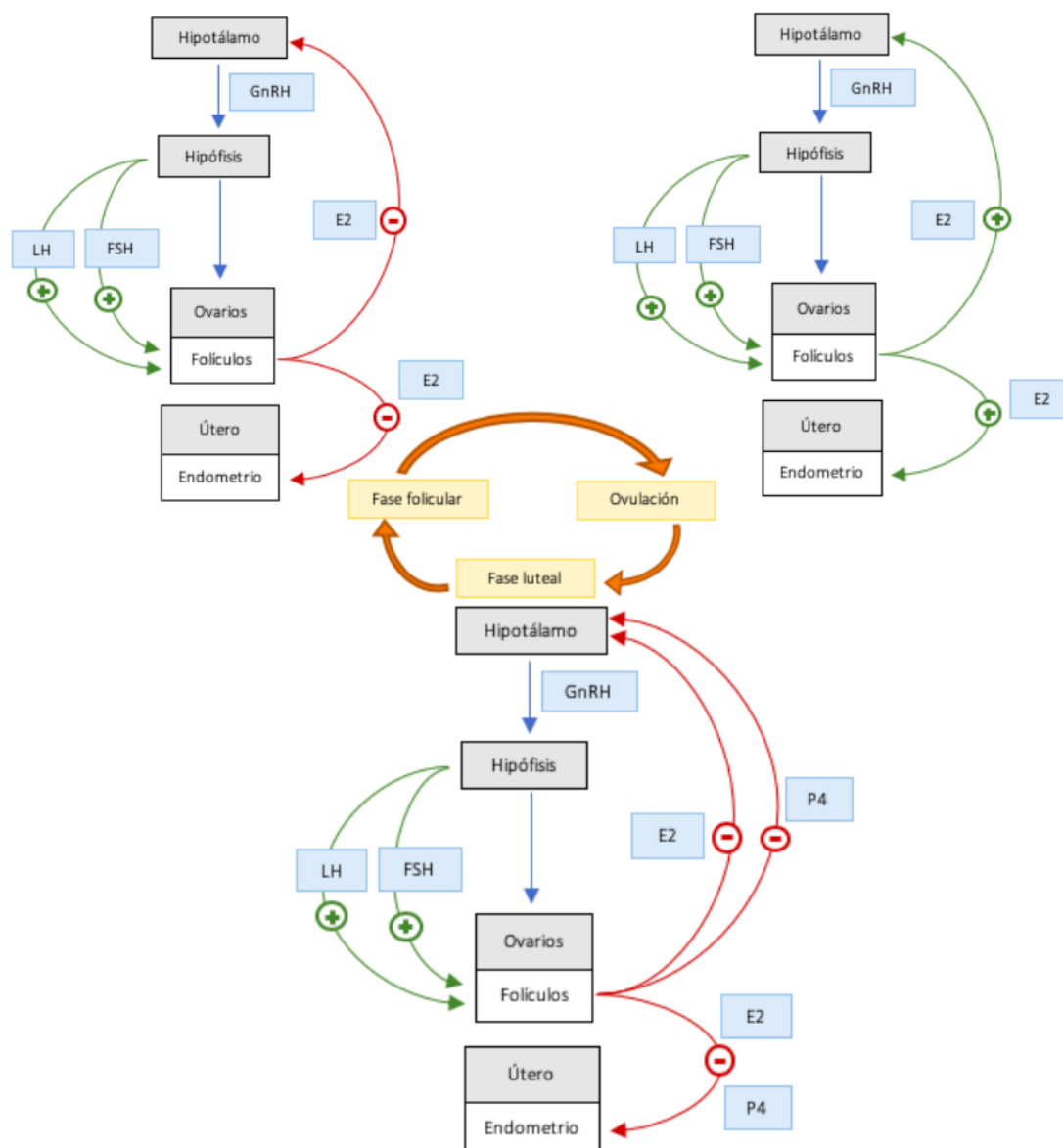


Imagen 3. Representación del eje HPG en una hembra dependiendo de la fase estral en la que se encuentre (amarillo). En gris vemos los receptores y los órganos dónde se sintetizan las hormonas. En recuadros azules vemos las hormonas reproductivas. En flechas verdes se puede observar los feedbacks positivos (estimulación) y en flechas rojas los feedbacks negativos (inhibición).

Fuente: adaptado de Rosenfield y Pizzuto (2018)

En hembras el mecanismo es más complicado y podríamos diferenciar tres fases del ciclo estral en que las hormonas y su función varían (imagen 3). En la fase folicular, se puede ver como el estradiol ejerce un efecto inhibitorio sobre la GnRH y el endometrio mientras que en la fase de ovulación la misma hormona provoca un efecto estimulante sobre los mismos objetivos anteriores. La LH y la FSH secretadas por la hipófisis ejercen siempre un efecto estimulador sobre el ovario y en concreto sobre los folículos, ayudando al reclutamiento, la maduración y al final la ovulación. En la fase luteal (presencia de cuerpo lúteo) podemos ver como entra en juego una nueva hormona, la P4, que desarrolla la misma función que el estradiol, limitar la producción la GnRH regulando así la liberación de las hormonas LH y FSH.

La inmunocostrucción puede tener diversos objetivos dependiendo del antígeno que uses, si hablamos de la vacuna PZP, el sistema inmune desarrolla inmunidad en contra de la ZP del óvulo, por lo tanto, el tejido diana de los anticuerpos es esta ZP. Si hablamos por el contrario de la vacuna anti-GnRH, el objetivo de ésta es que el sistema inmune desarrolle inmunidad contra la hormona GnRH y que se inhiba toda la cascada hormonal reproductiva.

La inmunidad se puede desarrollar de forma activa o pasiva, la primera se da cuando el propio mecanismo de defensa del individuo adquiere inmunidad por la entrada de un antígeno extraño al cuerpo, puede durar décadas o incluso toda la vida. Si hablamos de la inmunidad pasiva, hablamos de una inmunidad inducida, ya sea a través de la placenta (transplacentaria), por el calostro en los primeros días de vida o después de haber inoculado un antígeno producido por otro mamífero (vacunas). Esta inmunidad es de actividad limitada y de corta duración (de pocas semanas hasta meses). Aunque hoy en día esto último es poco relevante ya que la tecnología nos ha permitido poder llegar a crear vacunas de liberación lenta alargando así su tiempo de duración.

El concepto de inmunocostrucción implica la producción de anticuerpos contra el antígeno ligado a un receptor, hormona o proteína reproductiva del propio cuerpo, causando así una reacción inmunitaria. Los anticuerpos se ligan a estas moléculas creando una barrera o formando estructuras moleculares grandes. Esto inhibe la función principal en el mecanismo de fertilización, pero se debe mantener un título suficiente de anticuerpos.

El rol de los adyuvantes es de gran importancia. Se trata de un ingrediente aditivo cuya función es mejorar la respuesta inmunitaria innata creando una reacción inflamatoria controlada local. Hay diversos tipos de adyuvantes, los lipopolisacáridos, endotoxinas, parte de paredes bacterianas, RNA, DNA, Alum (sulfato de aluminio potásico hidratado) y emulsiones (aceite en agua/ agua en aceite; como el adyuvante de Freund: incompleto o IFA, modificado o FMA y

completo CFA)⁶. Estos adyuvantes son importantes en ungulados por su interacción con la prueba de la tuberculosis (TB). El adyuvante completo de Freud (FCA) contiene fragmentos de la pared de *Mycobacterium tuberculosis*, microorganismo que cause la tuberculosis y causa por la que el adyuvante es tan efectivo, dando falsos positivos en los animales tratados con la vacuna de ZP y este adyuvante. El adyuvante IFA proporciona una respuesta inmunitaria mucho menor al anterior, con dos inyecciones de refuerzo el título de anticuerpos se eleva hasta niveles efectivos y sin causar ningún tipo de interacción con la prueba de la TB. Lo mismo ocurre con el adyuvante MFA aunque este provoca una respuesta similar al primero y por lo tanto no es necesario las dosis de recordatorio¹³. Algunos adyuvantes funcionan también como mecanismo de liberación lenta, es decir, causan la formación de acúmulos en el sitio de inyección para que la vacuna se libere lentamente y los efectos así duren un largo tiempo⁶.

Los métodos más utilizados en hembras son la vacuna PZP (*porcine zona pellucida*) y la vacuna anti-GnRH. En machos también podemos usar la vacuna anti-GnRH y además tenemos un método poco usado pero que es exclusivo del sexo masculino llamado vacuna anti-EPPIN (*epididimal proteasa inhibitor*) (imagen 4). Normalmente las hembras son las que reciben el tratamiento hormonal ya que hay muchos más productos disponibles y sus efectos son más obvios. Puedes observar fácilmente si el método aplicado ha funcionado si se queda gestante o no. En contraste, un macho se tiene que poner bajo anestesia para mirar el nivel de esperma¹³. Por todo ello, en esta revisión nos centraremos en la vacuna PZP y la vacuna anti-GnRH.

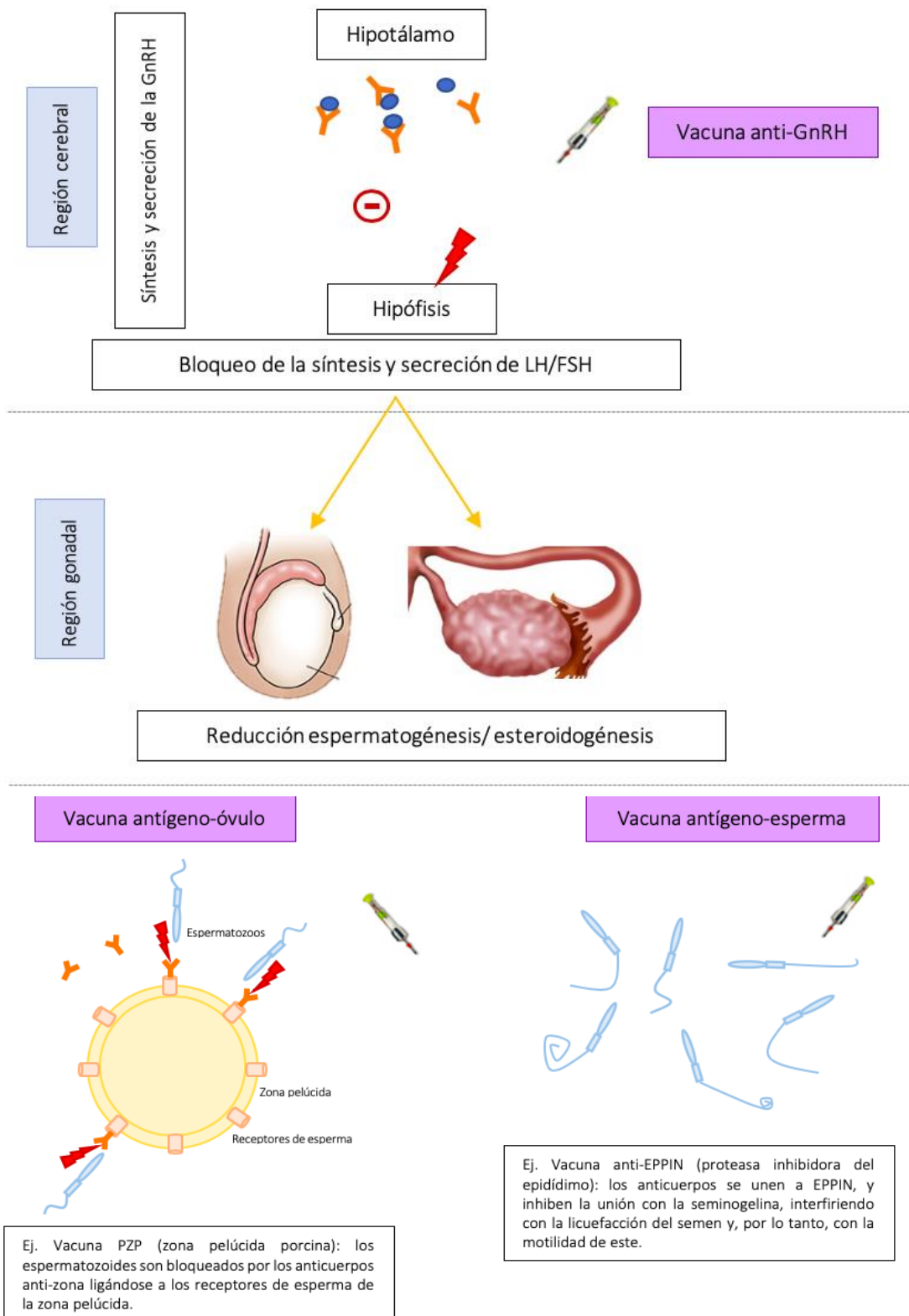


Imagen 4. Vista general de los objetivos de la inmuncontracepción.

Fuente: adaptado de Rosenfield y Pizzuto (2018)

Vacunas anti-ZP

Vacuna PZP

En los mamíferos, el óvulo está rodeado por una matriz glucoproteínica translúcida extracelular conocida como ZP. Actúa como un "sitio de acoplamiento" relativamente específico de la especie para la unión de los espermatozoides al ovocito, induce la exocitosis acrosomal en los espermatozoides unidos a la zona, previene la polispermia y desempeña un papel importante en la protección de un blastocisto preimplantado. Debido a su papel crítico en la reproducción, las glicoproteínas ZP se han utilizado como antígenos candidatos para la anticoncepción a través de la intervención inmunológica. La matriz de zona está compuesta de 3 o 4 glicoproteínas. En ratones, está compuesto de 3 glicoproteínas, es decir, glicoproteína ZP -1 (ZP1), -2 (ZP2) y -3 (ZP3), mientras que la matriz de ZP de cerdo y perro también está compuesta de 3 glicoproteínas, pero en lugar de glicoproteína ZP1, encontramos ZP4. En primates no humanos y humanos, la matriz de ZP se compone de 4 glicoproteínas que son ZP1, ZP2, ZP3 y ZP4. La estructura y funciones de las cuatro glicoproteínas ZP durante la fertilización de varias especies han sido investigadas por varios grupos¹. Las diferentes glicoproteínas ejercen funciones diferentes según la especie que hablemos y se diferencian las unas de las otras por su longitud (kDa).

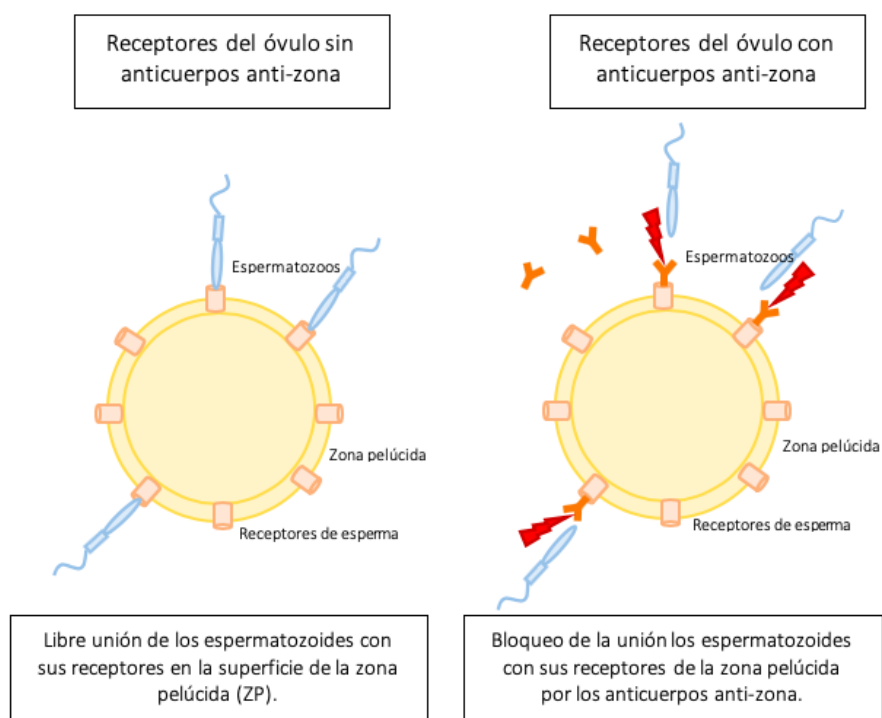


Imagen 5. Vacuna PZP; unión espermatozoides con sus receptores de la ZP con y sin anticuerpos.

Fuente: adaptado de Rosenfield y Pizzuto (2018)

La vacuna PZP se produce a partir de un antígeno de la ZP del cerdo. Una vez inoculado el antígeno PZP, su sistema inmune responderá produciendo anticuerpos. Aunque hay muchos artículos que hablan sobre el mecanismo de acción de esta vacuna aun no está del todo claro cómo actúan los anticuerpos creados y se proponen tres teorías para darle explicación a este fenómeno. La primera de ellas habla de que los anticuerpos actúan interrumpiendo o bloqueando el receptor de esperma uniéndose a él, modificando así la química y la estructura de la ZP y el óvulo (imagen 5). Esto resulta en un óvulo infértil sin más efectos secundarios o impactos comportamentales. Otra hipótesis propuesta se centra en el espermatozoide y se explica que los anticuerpos impiden la penetración de los espermatozoides al óvulo sin enlace en los receptores, en este caso los anticuerpos se unen al espermatozoide e inducen una reacción acrosomal inhibiendo al esperma. La tercera teoría es la inducción prematura de la reacción cortical, que se basa en la activación de los gránulos corticales para que el óvulo se vuelva resistente a la penetración.

Esta vacuna se ha usado en un gran amplio número de especies como: el bisonte norte americano (*Bison bison*), tahr himalayo (*H. jemlahicus*), ciervo sambar (*C. unicolor*), kudu (*Taurotragus strepsiceros*), ciervo de Sika (*C. nippon taiouanus and mandarinus*), wapiti (*C. elaphus*), reno (*Rangifer tarandus*), bongo (*Taurotragus euryceros*), markhor (*Capra falconeri*), carnero de las rocosas (*O. canadensis*), cabras de las rocosas (*Oreamnos americanus*), jirafa (*Giraffa camelopardalis*), cebra (*Equus zebra*, todas las subespecies), and íbex (*Capra capra*)^{2,3}.

Los estudios más recientes nos indican que las dos especies donde la inmuncontracepción con vacuna PZP se usa con frecuencia son el caballo semi-salvaje y el elefante para el control de la población salvaje. En estudios más antiguos, se ha demostrado el potencial anticonceptivo en especies como el conejo⁴, en perras⁵, en primates no-humanos^{6,7}, en venado de cola blanca⁸⁻¹⁰, en gamo¹¹ y en foca gris¹², entre otras.

Hay pocas marcas registradas de vacuna PZP y las pocas que existen son experimentales. Muchos zoológicos o centros obtienen su vacuna PZP de laboratorios o centros científicos donde las fabrican. Actualmente hay tres vacunas comerciales basadas en PZP (Tabla 1).

Tabla 1. Listado de vacunas comerciales basadas en la PZP y sus aplicaciones			
Vacunas comerciales PZP	Nombre de la compañía	Observaciones	Referencias
Spayvac®	ImmunoVaccineTechnologies™ , Halifax, Nova Scotia, Canada	<ul style="list-style-type: none"> - Habilidad para estimular las IgG 4/7. - Antígenos PZP se encuentran encapsulados en liposomas. - En yeguas no se vio relación entre el título de anticuerpos y la infertilidad. - Dos formulaciones: acuosa y no acuosa. - En elefantes la formulación no acuosa demostró tener una eficacia que duraba 7 años con una sola aplicación. 	25, 26, 12, 27, 28
ZonaStat-H	Humane Society of the United States, Washington, DC, USA	- Variación en el antígeno y en la formulación respectiva a la Spayvac®.	28, 30
PZP-22	University of Iowa, School of Pharmacy, Iowa City, USA	- Eficacia contraceptiva demostrada en yeguas.	28, 29

Spayvac® es una vacuna comercial que usa glicoproteínas PZP como antígeno junto con un adyuvante como MFA o AdyuVac®. A diferencia de ZonaStat-H, SpayVac® logra una eficacia de varios años con una sola dosis, sin refuerzos, porque los antígenos PZP están encapsulados dentro de liposomas, que liberan gradualmente las glucoproteínas PZP a las células presentadoras de antígeno durante un período prolongado. SpayVac® tiene dos presentaciones, una acuosa (VacciMax®) donde encontramos el antígeno en una emulsión (agua en aceite) y una no-acuosa (DepoVax®) donde el antígeno está liofilizado. En un estudio realizado en yeguas en 2018 se habla de la habilidad de Spayvac® para estimular preferentemente a las inmunoglobulinas (Ig) G 4/7, lo que podría explicar parte de su efecto immunocontraceptivo a largo plazo¹³. En el mismo estudio se propone usar estas inmunoglobulinas para diferenciar las yeguas infértiles por contracepción de las que necesitan una vacuna adicional¹³. Una revisión bibliográfica de 20 años de Spayvac® publicado en 2017 recoge artículos más antiguos que comprueban la efectividad de esta vacuna en diferentes especies, determinando que resulta efectiva en foca gris, venado de cola blanca, caballo y en el gamo. Por el contrario, en el gato doméstico no resultó efectiva y en el elefante

africano no se observaron resultados claros sobre la efectividad¹⁴ por lo que se requieren más estudios para poder concluir que el método es efectivo. En el artículo de Roelle et al. 2017 donde se estudió la efectividad del método en yeguas no se vio una relación clara entre el título de anticuerpos y la duración del método, es decir, un mayor título de anticuerpos no significó una durabilidad más larga de los efectos de la vacuna¹⁵. La respuesta de la vacuna Spayvac® (fórmula no acuosa: DepoVaxx®) en 3 elefantes africanos hembra ha sido esperanzadora, llegando a inmunizar a las hembras durante 7 años con una sola aplicación de la vacuna. Aun así, se necesitan más estudios con más ejemplares para poder determinar los efectos anticonceptivos de la vacuna y las secuelas a largo tiempo sobre la fertilidad¹⁶. Spayvac® tiene un gran potencial como vacuna anticonceptiva a largo plazo, pero la gran variabilidad entre especies y ecosistemas hacen que sean necesarios más estudios para poder reafirmar la efectividad de esta vacuna en mamíferos salvajes.

Otras dos vacunas comerciales experimentales son ZonaStat-H y PZP-22. Son vacunas con variaciones en la preparación y en la formulación, pero con el mismo antígeno, la PZP¹⁷. Tienen una efectividad más a corto plazo y la eficacia de estos métodos experimentales se ha demostrado en yeguas, en el caso de PZP-22, con una duración de hasta tres años¹⁸. Estudios más antiguos han comprobado la eficacia de la vacuna ZonaStat-H también en yeguas y en burras concluyendo que la vacuna reduce en un 86% la fertilidad en ambas especies¹⁹. Otro estudio en bisontes (*Bison bison*) en la isla Catalina, donde es una especie introducida, el fármaco resultó ser efectivo y los animales tardaron en recobrar la fertilidad 4-5 años post tratamiento. Las vacunas anticonceptivas basadas en la zona pelúcida porcina no solo han demostrado su efectividad sino también su seguridad en mamíferos²⁰.

Hay varias razones biológicas por las cuales una vacuna anticonceptiva PZP podría fallar. El primer fracaso de la vacuna podría venir por no obtener un título suficiente de anticuerpos, muy probablemente causado por una relativa homología entre PZP y la ZP de los animales tratados. El mejor ejemplo de ello es el fracaso de PZP para generar anticuerpos significativos en cualquier miembro de la familia *Suidae* donde el antígeno se identifica como propio²¹. La segunda causa de fallo son las reacciones cruzadas con las proteínas receptoras de esperma de la ZP del animal. Esto por ejemplo ocurre debido a las diferencias entre los epítomos de la zona del gato y el cerdo, donde, aunque se pueden generar anticuerpos inoculando gatos con PZP, pero estos no causarán impedimento al esperma para unirse al receptor de la ZP del gato²². La tercera razón de fallo se da por una mala planificación de la inmunización en la temporada de reproducción, donde el título de anticuerpos necesita ser más elevado para la anticoncepción²¹.

La mayor causa de fracaso no biológico en la contracepción con la vacuna PZP es debido a la mala administración de las inyecciones. El estudio de M. Paterson and R. Aitken en 1990 recopiló información sobre el efecto de los posibles fallos terapéuticos en diferentes especies. En jirafas, la eficacia contraceptiva fue del ~ 95%, cuando se tuvieron en cuenta los fallos técnicos. En cebras, hubo un solo fallo biológico entre los 30 animales tratados, de los cuales tres se quedaron gestantes por no administrar según la prescripción. Tres de 18 bisontes se quedaron gestantes después de una inoculación inicial ya que no se llegó a completar las tres inoculaciones indicadas con ese tratamiento antes de juntar hembras y machos²³.

Vacunas basadas en otras ZP

En los últimos años se ha intentado desarrollar alguna técnica alternativa a la vacuna PZP usando la ZP de alguna otra especie. La vacuna recombinante de ZP de conejo no está disponible como una vacuna comercial, pero se han hecho estudios que demuestran que tiene capacidad para reducir el número de crías de la camada¹³. Un estudio comparó la eficacia de la ZP de conejo recombinante, con la PZP y un grupo control de venado de cola blanca. Aunque se vio que la PZP era más efectiva en reducir la tasa de gestación en las hembras, curiosamente se observó que entre un 43-63% las hembras a las que se les administró vacunas de ZP de conejo tuvieron una cría en vez de las dos habituales en la especie¹³.

Estudios más antiguos han probado otros inmunógenos como candidatos para sustituir la PZP. La inmunización de babuinos hembra (*Papio anubis*) con E. coli recombinado con ZP4 de macaco coronado (*Macaca radiata*) junto con toxoide diftérico (DT) condujo a un bloqueo reversible de la fertilidad⁴⁵. Sin embargo, la prueba de este compuesto en los macacos coronados hembra condujo a una inhibición de la fertilidad irreversible. La histología de los ovarios de los monos inmunizados reveló atresia folicular⁴⁶. La inmunización activa de titíes hembra (*Callithrix jacchus*) con ZP3 humana recombinante, también condujo a la inhibición de la fertilidad asociada con la patología ovárica caracterizada por el agotamiento del conjunto de folículos primordiales⁴⁷. Estos estudios en primates no humanos mostraron el potencial de las proteínas de zona recombinantes como inmunógenos candidatos para el desarrollo de la vacuna anticonceptiva entre especies, aunque se necesitan más investigaciones sobre los efectos secundarios sobre la fertilidad a largo plazo, como la posibilidad de una contracepción no reversible.

Con el fin de controlar la población de perros callejeros y, por lo tanto, reducir la carga de infección por rabia en algunas partes del mundo, se demostró que las perras inmunizadas con su ZP3 recombinada con E. coli y conjugada con DT no lograron concebir⁴⁹. Experimentalmente, en Australia y Nueva Zelanda, también se ha explorado el potencial de la proteína ZP3

recombinante de zarigüeya (*Trichosurus vulpecula*) para controlar la fertilidad de Koalas (*Phascolarctos cinereus*) y canguros grises orientales (*Marcopus giganteus*)^{51,52}.

Vacuna anti-GnRH

La GnRH es un decapeptido (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-GlyNH₂) que se sintetiza y secreta principalmente por el hipotálamo, a pesar de su presencia y/o secreción en otros tejidos como el ovario, testículos, próstata y placenta¹. El método a resultado efectivo en un amplio rango de mamíferos, tanto en hembras y machos de venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*)²⁻⁴, hembras de bisonte americano (*Bison bison*)⁵, machos y hembras de jabalí (*Sus scrofa*)⁶ y en caballo y yeguas semi-salvajes (*Equus caballus*)⁷⁻⁹.

La inmunización contra la GnRH se consigue acoplando el péptido sintético de GnRH a una proteína externa con un microorganismo patogénico muerto, para activar la antigenicidad. Para desarrollar una vacuna anticonceptiva, la GnRH se ha conjugado con varias proteínas portadoras como el toxoide tetánico (TT), el toxoide diftérico (DT), la hemocianina de la lapa californiana (KLH), la proteína azul del molusco (*Concholepas concholepas*) o la ovoalbúmina, hecho que sirve de ayuda a las células T para facilitar la generación de anticuerpos contra la GnRH. De esta manera se forman complejos proteicos de GnRH. El mecanismo de acción es discutido por diversos autores, surgiendo dos teorías. Existe la posibilidad de que los complejos formados sean demasiado grandes para atravesar la membrana hipofisaria o por el contrario, que si puedan llegar hasta los receptores pero que el anticuerpo compita con los receptores, inhabilitando la GnRH. En cualquier caso, lo que se producirá es una falta de secreción de gonadotropinas, inhibiendo la formación de hormonas sexuales y la gametogénesis (imagen 6). Esta disminución continuada de la liberación de LH y FSH produce una atrofia de las gónadas y, por lo tanto, una infertilidad en ambos sexos¹⁰⁻¹³.

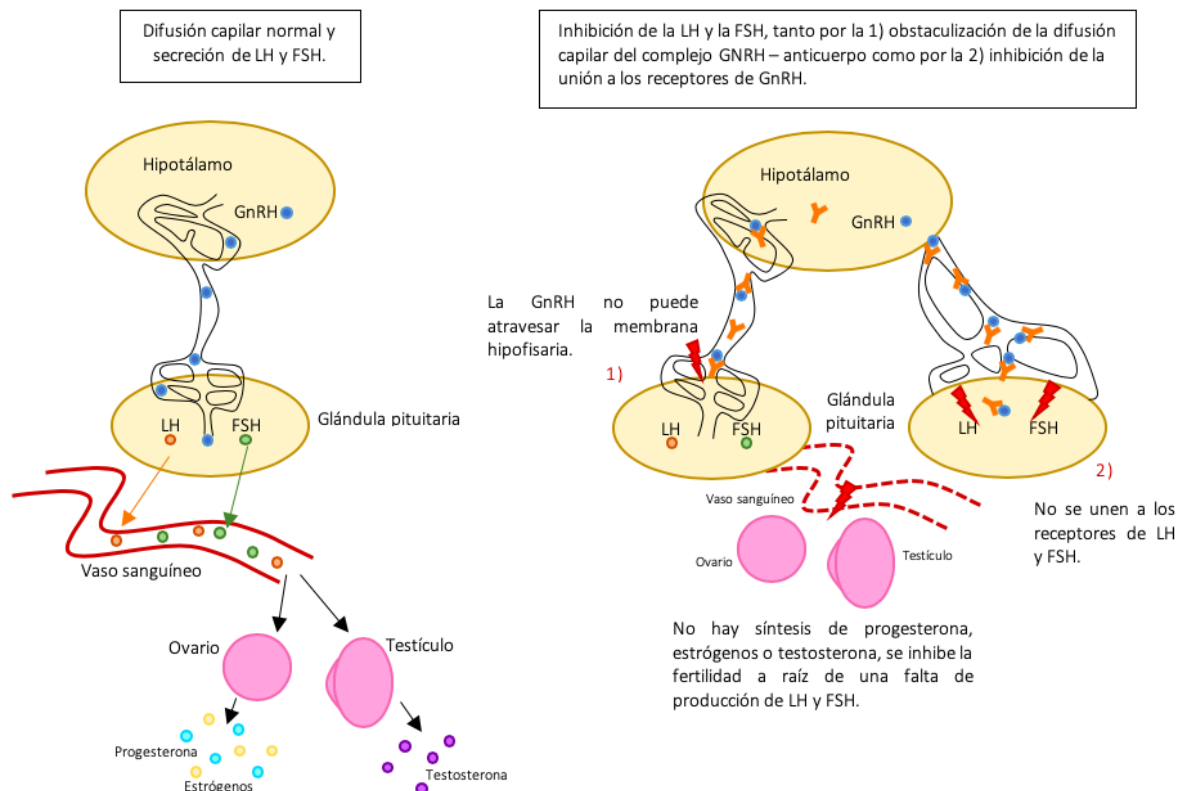


Imagen 6. Mecanismo de la GnRH; normal y con inhibición por anticuerpos anti-GnRH

Fuente: adaptado de Rosenfield y Pizzuto (2018)

Las vacunas anticonceptivas basadas en GnRH funcionan tanto en machos como en hembras, ya que la neutralización de su actividad biológica inhibe la producción de esperma en machos y óvulos maduros en hembras. Actualmente hay al menos seis vacunas comerciales disponibles (tabla 2).

Tabla 2. Listado de vacunas comerciales basadas en la anti-GnRH y sus aplicaciones			
Vacuna anti-GnRH	Nombre de la compañía	Observaciones	Referencias
GonaCon™	National Wildlife Research Centre, USA	<ul style="list-style-type: none"> - Buen método para controlar la población de tejones en UK sin consecuencias para el bienestar animal. - En el ganado semi-salvaje de Hong Kong se redujo la fertilidad de un 76% a un 6% tras la aplicación de dos inyecciones de la vacuna, sin efectos secundarios. - La dosis de recordatorio es crítica para inducir la infertilidad. 	40,41,42,43, 44,45

		<ul style="list-style-type: none"> - En grupos de caballos semi-salvajes, se ha demostrado el descenso de gestaciones. - Efectivo método de control en ardillas zorro oriental sin efectos secundarios. - En venado de cola blanca a demostrado ser más efectiva la inyección manual que la inyección por dardo. - Método efectivo en alces de las montañas rocosas en los cuales reduce el porcentaje de gestación durante 1-2 años. 	
Improvac®	Pfizer Animal Health, Australia	<ul style="list-style-type: none"> - En elefante macho ha resultado ser un método eficaz el cual después de su aplicación durante 2-4 años los efectos son similares a la castración quirúrgica. - En verracos mejora ligeramente la calidad de la carne si comparas con machos enteros mientras que la castración quirúrgica mejora sustancialmente su calidad. En cerdas no se ha visto tal mejora. 	46,47,48,49
Improvast®	Zoetis, Kalamazoo, MI, USA	- Castración en verracos para mejorar la calidad de la carne.	50
Equity™	CSL, West Ryde, NSW, Australia	- Supresión de la función testicular en elefantes macho.	51,52

Gonacon™ desarrollado por el National Wildlife Research Center, EEUU está compuesto por GnRH sintético acoplado a KLH y suministrado con AdyuVac™ (versión diluida de la vacuna contra la enfermedad de Jones que contiene micobacterias muertas y adyuvante oleoso). Se ha demostrado la eficacia de la vacuna en una amplia variedad de especies. Los estudios más recientes manifiestan su eficacia en el alce de las montañas rocosas (*Cervus Elaphus Nelsoni*) donde se administró Gonacon™ a 60 hembras y otras 60 hembras fueron del grupo control. Se vio que la fertilidad en este segundo grupo fue del 75.90% mientras que en el primer grupo la fertilidad el primer año fue nula, el segundo año aumento 31% y el tercer año 65%. Los resultados señalan que la efectividad del producto es de 1-2 años en esta especie¹⁴. Se determinó la efectividad a largo plazo de Gonacon™ en yeguas semi-salvajes y se determinó que en hembras

el porcentaje de gestaciones con una sola inyección fue inferior al de las hembras sin inmunizar pero la vacuna revertía antes (1-2 años), mientras que las hembras con una dosis de recordatorio tuvieron un porcentaje menos de crías y el efecto de la vacuna duró 3-4 años¹⁷. En Hong Kong se testó Gonacon™ en un grupo de ganado salvaje y se observó que la proporción de animales gestantes en el grupo tratado con GonaCon™ disminuyó del 76% en la vacunación inicial al 6% un año después de la vacunación, en comparación con el 67% y el 57% respectivamente en el grupo control¹⁸. Los tejones se consideran una plaga en el reino unido, con tal de aplacar estos invasores se realizó un estudio de immunocontracepción que usaba Gonacon™ con unos resultados esperanzadores, aun así, la vacuna debía repetirse a los dos años para que siguiera el efecto contraceptivo¹⁹. Todos estos estudios confirman que GonaCon es seguro y eficaz para inducir la infertilidad en animales salvajes, con una dosis de refuerzo crítica para mantener la infertilidad.

Otra vacuna comercial anticonceptiva basada en GnRH, Improvac®, consiste en un análogo sintético incompleto del factor liberador de gonadotropina (GnRF) unido a una proteína portadora para hacerla inmunogénica. La inmunización de cerdos ibéricos mestizos con Improvac® redujo la incidencia de los niveles de progesterona sérica estresante en reposo, y el desarrollo de útero y ovarios²⁰. La inmunización llevó a una inmunidad duradera de al menos 20 meses después de la tercera inyección²⁰. La inmunización de elefantes africanos (*Loxodonta Africana*) con Improvac® condujo a la supresión de la fertilidad con un efecto similar a la castración quirúrgica después de los 2-4 años de aplicación con un protocolo de inyecciones cada 5-7 meses²³.

La inmunización de un elefante asiático macho con la combinación de dos vacunas anticonceptivas comerciales basadas en GnRH, Improvac® y Equity™, condujo a una disminución de las concentraciones séricas de testosterona, diámetro de los testículos y atrofia del pene²⁴. Después de 1 año de tratamiento inicial, no se observaron espermatozoides en el semen, lo que sugiere que la vacuna contra la GnRH puede ser un método anticonceptivo no invasivo útil para los elefantes asiáticos²⁴.

Improvast® (Zoetis, Kalamazoo, MI, EE. UU.), Se ha utilizado para la castración de cerdos machos y para mejorar la calidad de la carne^{25,26}.

Immunocontracepción con el tracto masculino como diana

La immunocontracepción en machos implica aprovechar el sistema inmunitario para interrumpir la gametogénesis. Aunque el objetivo del desarrollo de vacunas anticonceptivas es

controlar los niveles de testosterona, ha habido poca investigación de vacunas dirigidas a esta hormona reproductiva masculina clave. Las primeras investigaciones se llevaron a cabo en la década de 1970 y demostraron que la inmunización con testosterona resulta en un incremento de la producción de ésta a través de la retroalimentación negativa⁶⁶. Por lo tanto, la inhibición de la función de testosterona se ha logrado generalmente mediante el desarrollo de vacunas que inhiben la acción de GnRH, FSH y LH, las cuales son responsables de control de la producción de la hormona.

Actualmente, el enfoque se ha alejado de los objetivos hormonales y se ha centrado en aquellos involucrados en el desarrollo y la función del gameto masculino. Estos incluyen el propio espermatozoide, las proteínas epididimales y otros objetivos reproductivos masculinos potenciales.

Eppin

El inhibidor de la proteasa epididimaria (Eppin) es uno de los objetivos epididimarios más prometedores. Es una proteína antimicrobiana rica en cisteína que es importante para la motilidad de los espermatozoides. Eppin se expresa abundantemente en testículos y epidídimo. Los estudios de PCR también han demostrado que el ARNm (ARN mensajero) de Eppin se encuentra en células de Sertoli y células espermátogénicas. Se cree que la Eppin asociada a espermatozoides es secretada principalmente por las células epiteliales del epidídimo. Los estudios de proteínas con péptidos primarios han demostrado que todos los animales inyectados con Eppin seguido de un refuerzo indujo anticuerpos IgG_{2b} e IgG₁ específicos de antígeno⁷⁰.

Un estudio que se llevó a cabo en 2014, se observó que la vacuna inmuocontraceptiva contra Eppin inducía infertilidad en primates no-humanos aunque no se investigó el efecto inmunopatológico de la inmunización⁷¹. Se observó un alto título de anticuerpos en el 78% de los machos inunizados⁷¹. En otro artículo del mismo año, se investigó la efectividad de una vacuna anti-eppin vía nasal, se observaron un alto título de anticuerpos con un mayor número de IgA anti-eppin en el tracto genital⁷². Este estudio consiguió una inhibición de la fertilidad (de 91,7% a 31,7% de los machos fértiles) en machos sin ninguna interferencia con la función testicular y sin alteraciones de la integridad estructural⁷².

La inmuocontracepción para los machos sigue siendo un método novedoso con cierto potencial, siendo necesaria la búsqueda de nuevo antígenos diana y más investigación sobre su eficacia y efectos secundarios.

Conclusiones

Ante el conflicto de humanos y fauna salvaje, nos encontramos frente a un dilema para solucionar esta interacción, ¿es ética la eutanasia de estos animales sanos que interaccionan con la vida del ser humano?

Los métodos anticonceptivos son una alternativa eficaz al sacrificio de estos animales, pero puede suponer un gran reto la administración de algunos de estos medicamentos. Por lo que se busca un método que sea efectivo, fácil de administrar y con un efecto duradero. La inmunocostracepción es un método anticonceptivo innovador que proporciona infertilidad a largo plazo con una sola aplicación. Este método anticonceptivo actúa activando el sistema inmunitario y creando anticuerpos contra proteínas y moléculas del propio cuerpo.

Entre las ventajas de este método destacan la elevada efectividad, la alta durabilidad de los efectos con un solo tratamiento en ambos sexos y su asequible coste. La administración de las vacunas durante la gestación no la interrumpen ni influyen en la salud de la descendencia⁵⁷. Por el contrario, puede dar lugar reacciones en el sitio de inoculación que puede ir de abscesos (adyuvante FCA) a pequeños granulomas (adyuvante FMA) o una simple inflamación en el lugar de inoculación^{13,74,75}. Pese a esto último, los efectos secundarios parecen ser raros y sin mayor importancia¹³. Aunque faltan estudios que investiguen los efectos de la vacuna a largo plazo no hay indicios de que pueda tener consecuencias a largo plazo ni impacto en caracteres sexuales secundarios.

La inmunocostracepción supone un gran avance tecnológico en el área de la reproducción, ideal para animales en libertad. El futuro de este método es prometedor, pudiendo llegar a ser un posible final al conflicto entre humanos y fauna salvaje.

Bibliografía y webgrafía

1. Du Toit, J. T. Coexistence between People and Elephants in African Savannas. (1999). doi:10.1046/j.1523-1739.1999.98035.x
2. Diamond, J. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication.
3. Asa, C. S. & Porton, I. J. *Wildlife Contraception: Issues, Methods, and Applications*. (Johns Hopkins University Press, 2005).
4. Jewell, P. A. *Problems in Management of Locally Abundant Wild Mammals*. (Elsevier Science, 2012).
5. Van der Peet, S. Wildlife Damage Control. *Austral Ecol.* **32**, 720-720 (2007).
6. Rosenfield, D. A. & Pizzutto, C. S. Wildlife population control – reproductive physiology under the influence of contraceptive methods in mammalian wildlife, with emphasis on immunocontraception: the best choice? A literature review. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* **55**, 1 (2018).
7. S. Bechert, U. & A. Fraker, M. Twenty years of SpayVac® research: potential implications for regulating feral horse and burro populations in the United States. **12**, 117-130 (2018).
8. Choudhury, A. Human-Elephant Conflicts in Northeast India. *Hum. Dimens. Wildl.* **9**, 261-270 (2004).
9. Madden, F. Creating Coexistence between Humans and Wildlife: Global Perspectives on Local Efforts to Address Human-Wildlife Conflict. *Hum. Dimens. Wildl.* **9**, 247-257 (2004).
10. Asa, C. S. The Development of Contraceptive Methods for Captive Wildlife. *Contracept. Wildl. Manag.* **10**, 234-240 (1993).
11. Hardy, C. M. & Braid, A. L. Vaccines for immunological control of fertility in animals. *Rev. Sci. Tech.* **26**, 461-470 (2007).
12. Kaur, K. & Prabha, V. Immunocontraceptives: New Approaches to Fertility Control. *Biomed Res. Int.* **2014**, 1-15 (2014).
13. M.L., P., W., J. & L.M., P. Review of Contraception in Ungulate Species. *Zoo Biology* **26**, 105-115 (2007).
14. Powers, J. G., Baker, D. L. & Nett, T. M. *Wild ungulate contraception: Use of GnRH agonist or GnRH vaccine to control reproduction in captive and free-ranging female elk (Cervus elaphus nelsoni)*. (2014).

15. Baker, D. L. *et al.* GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE AGONIST: A NEW APPROACH TO REVERSIBLE CONTRACEPTION IN FEMALE DEER. *J. Wildl. Dis.* **40**, 713-724 (2004).
16. M, P. & RJ, A. Development of vaccines targeting the zona pellucida: IV. Species differences in response to the porcine zona pellucida vaccine, timing of booster inoculations, and procedural failures. *Curr. Opin. Immunol.* **2**, 743-7 (1990).
17. Kirkpatrick, J. F., Calle, P. P., Kalk, P., Liu, I. K. M. & Jr., J. W. T. Immunocontraception of Captive Exotic Species. II. Formosan Sika Deer (*Cervus nippon taiouanus*), Axis Deer (*Cervus axis*), Himalayan Tahr (*Hemitragus jemlahicus*), Roosevelt Elk (*Cervus elaphus roosevelti*), Reeves' Muntjac (*Muntiacus reevesi*), and Sambar Deer (*Cervus unicolor*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **27**, 482-495
18. Deigert, F. A., Duncan, A. E., Frank, K. M., Lyda, R. O. & Kirkpatrick, J. F. Immunocontraception of captive exotic species. III. Contraception and population management of fallow deer (*Cervus dama*). *Zoo Biol.* **22**, 261-268 (2003).
19. Walter, W. D. *et al.* Ungulate Research and Management Evaluation of immunocontraception in a free-ranging suburban white-tailed deer herd. **30**, 186-192 (2016).
20. Miller, L. A., Johns, B. E. & Killian, G. J. Immunocontraception of white-tailed deer with GnRH vaccine. *Am. J. Reprod. Immunol.* **44**, 266-274 (2000).
21. Rutberg, A. T., Naugle, R. E., Thiele, L. A. & Liu, I. K. M. Effects of immunocontraception on a suburban population of white-tailed deer *Odocoileus virginianus*. *Biol. Conserv.* **116**, 243-250 (2004).
22. Miller, L. A., Rhyan, J. C. & Drew, M. CONTRACEPTION OF BISON BY GnRH VACCINE: A POSSIBLE MEANS OF DECREASING TRANSMISSION OF BRUCELLOSIS IN BISON. *J. Wildl. Dis.* **40**, 725-730 (2013).
23. Killian, G., Miller, L., Rhyan, J. & Doten, H. Immunocontraception of florida feral swine with a single-dose GnRH vaccine. *Am. J. Reprod. Immunol.* **55**, 378-384 (2006).
24. Roelle, J. E., Germaine, S. S., Kane, A. J. & Cade, B. S. Efficacy of SpayVac® as a contraceptive in feral horses. *Wildl. Soc. Bull.* **41**, 107-115 (2017).
25. Ransom, J. I. *et al.* Behavior of feral horses in response to culling and GnRH immunocontraception. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **157**, 81-92 (2014).

26. TURNER, J. W., LIU, I. K. M., FLANAGAN, D. R., RUTBERG, A. T. & KIRKPATRICK, J. F. Immunocontraception in Wild Horses: One Inoculation Provides Two Years of Infertility. *J. Wildl. Manage.* **71**, 662-667 (2007).
27. Gupta, S. K. *et al.* Mammalian zona pellucida glycoproteins: Structure and function during fertilization. *Cell and Tissue Research* **349**, 665-678 (2012).
28. Skinner, S. M., Mills, T., Kirchick, H. J. & Dunbar, B. S. Immunization with zona pellucida proteins results in abnormal ovarian follicular differentiation and inhibition of gonadotropin-induced steroid secretion. *Endocrinology* **115**, 2418-2432 (1984).
29. Mahi-Brown, C. A., Yanagimachi, R., Hoffman, J. C. & Huang, T. T. Fertility Control in the Bitch by Active Immunization with Porcine Zonae Pellucidae: Use of Different Adjuvants and Patterns of Estradiol and Progesterone Levels In Estrous Cycles. *Biol. Reprod.* **32**, 761-772 (1985).
30. H. Bagavant, P. Thillai-Koothan, M. G. Sharma, G. P. T. and S. K. G. Antifertility effects of porcine zona pellucida-3 immunization using permissible adjuvants in female bonnet monkeys (*Macaca radiata*): reversibility, effect on follicular development and hormonal profiles. (1994).
31. Sacco, A. G., Pierce, D. L., Subramanian, M. G., Yurewicz, E. C. & Richard Dukelow, W. *Ovaries Remain Functional in Squirrel Monkeys (Saimiri sciureus) Immunized with Porcine Zona Pellucida 55,000 Macromolecule.* *BIOLOGY OF REPRODUCTION* **36**, (1987).
32. HERNANDEZ, S. *et al.* Effects of SpayVac® on Urban Female White-Tailed Deer Movements. *Wildl. Soc. Bull.* **34**, 1430-1434 (2006).
33. Locke, S. L. *et al.* Effectiveness of Spayvach for Reducing White-tailed Deer Fertility. *SHORT COMMUNICATIONS Journal of Wildlife Diseases* **43**, (2007).
34. Miller, L. A. *et al.* Human-Wildlife Interactions Wildlife Damage Management, Internet Center for Factors contributing to the success of a single-shot, multiyear PZP immunocontraceptive vaccine for white-tailed deer. (2009).
35. Fraker, M. A., Brown, R. G., Gaunt, G. E., Kerr, J. A. & Pohajdak, B. Long-Lasting, Single-Dose Immunocontraception of Feral Fallow Deer in British Columbia. *J. Wildl. Manage.* **66**, 1141 (2002).
36. Brown, R. . *et al.* Temporal trends in antibody production in captive grey, harp and hooded seals to a single administration immunocontraceptive vaccine. *J. Reprod. Immunol.* **35**, 53-64 (1997).

37. Bechert, U., Rohde, J., Freer, H. & Wagner, B. IgG4/7 responses correlate with contraception in mares vaccinated with SpayVac. *Theriogenology* **121**, 168-174 (2018).
38. Bechert, U. S. & Fraker, M. A. Twenty years of SpayVac® research: Potential implications for regulating feral horse and burro populations in the United States. *Human-Wildlife Interact.* **12**, 117-130 (2018).
39. Berchert, U. The response of African elephants to a single dose of SpayVac®, a pZP contraceptive vaccine, over a seven-year period. *Pachyderm* **0**, 97-108 (2018).
40. Mask, T. A., Schoenecker, K. A., Kane, A. J., Ransom, J. I. & Bruemmer, J. E. Serum antibody immunoreactivity to equine zona protein after SpayVac vaccination. *Theriogenology* **84**, 261-267 (2015).
41. Rutberg, A., Grams, K., Turner Jr, J. W. & Hopkins, H. Contraceptive efficacy of priming and boosting doses of controlled-release PZP in wild horses. *Wildl. Res.* **44**, 174 (2017).
42. Kirkpatrick, J. F., Rutberg, A. T., Coates-Markle Compiler, L. & Fazio, P. M. *Immunocontraceptive Reproductive Control Utilizing Porcine Zona Pellucida (PZP) in Federal Wild Horse Populations.* (2012).
43. Gupta, S. K. & Minhas, V. Wildlife population management are contraceptive vaccines a feasible proposition. *Front. Biosci.* **9**, 492 (2017).
44. K Jewgenow, M. R. and I. W. Differences between antigenic determinants of pig and cat zona pellucida proteins. **119**, 15–23 (2000).
45. Govind, C. K. & Gupta, S. K. Failure of female baboons (*Papio anubis*) to conceive following immunization with recombinant non-human primate zona pellucida glycoprotein-B expressed in *Escherichia coli*. *Vaccine* **18**, 2970-2978 (2000).
46. Govind, C. K., Srivastava, N. & Gupta, S. K. Evaluation of the immunocontraceptive potential of *Escherichia coli* expressed recombinant non-human primate zona pellucida glycoproteins in homologous animal model. *Vaccine* **21**, 78-88 (2002).
47. PATERSON, M., WILSON, M. R., MORRIS, K. D., DUIN, M. & AITKEN, R. J. Evaluation of the Contraceptive Potential of Recombinant Human ZP3 and Human ZP3 Peptides in a Primate Model: Their Safety and Efficacy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **40**, 198-209 (1998).
48. ML Martinez and JD Harris. Effectiveness of zona pellucida protein ZPB as an immunocontraceptive antigen. (2000).

49. N Srivastava, R Santhanam, P Sheela, S Mukund, SS Thakral, B. M. and S. G. Evaluation of the immunocontraceptive potential of Escherichia coli-expressed recombinant dog ZP2 and ZP3 in a homologous animal model. (2002).
50. Shrestha, A., Srichandan, S., Minhas, V., Panda, A. K. & Gupta, S. K. Canine zona pellucida glycoprotein-3: Up-scaled production, immunization strategy and its outcome on fertility. *Vaccine* **33**, 133-140 (2015).
51. Kitchener, A. L. *et al.* Immunocontraception of Eastern Grey kangaroos (*Macropus giganteus*) with recombinant brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) ZP3 protein. *J. Reprod. Immunol.* **79**, 156-162 (2009).
52. Kitchener, A. L. *et al.* The immune response and fertility of koalas (*Phascolarctos cinereus*) immunised with porcine zonae pellucidae or recombinant brushtail possum ZP3 protein. *J. Reprod. Immunol.* **82**, 40-47 (2009).
53. Powers, J. G. *et al.* Effects of GonaCon immunocontraceptive vaccine in free-ranging female Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*). *Wildl. Soc. Bull.* **38**, 650-656 (2014).
54. Evans, C. S., DeNicola, A. J., Eisemann, J. D., Eckery, D. C. & Warren, R. J. Administering GonaCon™ to white-tailed deer via hand-injection versus syringe-dart. *Human-Wildlife Interact.* **9**, 265-272 (2015).
55. Krause, S. K., Van Vuren, D. H., Laursen, C. & Kelt, D. A. Behavioral effects of an immunocontraceptive vaccine on eastern fox squirrels. *J. Wildl. Manage.* **79**, 1255-1263 (2015).
56. Baker, D. L. *et al.* Reimmunization increases contraceptive effectiveness of gonadotropin-releasing hormone vaccine (GonaCon-Equine) in free-ranging horses (*Equus caballus*): Limitations and side effects. *PLoS One* **13**, e0201570 (2018).
57. Massei, G. *et al.* Fertility control for managing free-roaming feral cattle in Hong Kong. *Vaccine* **36**, 7393-7398 (2018).
58. Cowan, D. *et al.* Evaluation of a single-shot gonadotropin-releasing hormone (GnRH) immunocontraceptive vaccine in captive badgers. *Eur. J. Wildl. Res.* **65**, 59 (2019).
59. Dalmau, A. *et al.* Use of an anti-GnRF vaccine to suppress estrus in crossbred Iberian female pigs. *Theriogenology* **84**, 342-347 (2015).

60. Karaconji, B., Lloyd, B., Campbell, N., Meaney, D. & Ahern, T. Effect of an anti-gonadotropin-releasing factor vaccine on sexual and aggressive behaviour in male pigs during the finishing period under Australian field conditions. *Aust. Vet. J.* **93**, 121-123 (2015).
61. Oliviero, C. *et al.* Strategic use of anti-GnRH vaccine allowing selection of breeding boars without adverse effects on reproductive or production performances. *Theriogenology* **85**, 476-482 (2016).
62. Lueders, I. *et al.* Effects of GnRH vaccination in wild and captive African Elephant bulls (*Loxodonta africana*) on reproductive organs and semen quality. *PLoS One* **12**, e0178270 (2017).
63. Lueders, I. *et al.* SUPPRESSION OF TESTICULAR FUNCTION IN A MALE ASIAN ELEPHANT (*ELEPHAS MAXIMUS*) TREATED WITH GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE VACCINES. *J. Zoo Wildl. Med.* **45**, 611-619 (2014).
64. Tavárez, M. A. *et al.* Effects of time after a second dose of immunization against GnRF (Improvest) independent of age at slaughter on commercial bacon slicing characteristics of immunologically castrated barrows. *Meat Sci.* **111**, 147-153 (2016).
65. Lowe, B. K. *et al.* Ham and belly processing characteristics of immunological castrated barrows (Improvest) fed ractopamine hydrochloride (Paylean). *Meat Sci.* **112**, 103-109 (2016).
66. WICKINGS, E. J., BECHER, A. & NIESCHLAG, E. Testosterone Metabolism in Rabbits Actively Immunized with Testosterone. *Endocrinology* **98**, 1142-1146 (1976).
67. Silva, E. J. R., Patrão, M. T. C. C., Tsuruta, J. K., O'Rand, M. G. & Avellar, M. C. W. Epididymal protease inhibitor (EPPIN) is differentially expressed in the male rat reproductive tract and immunolocalized in maturing spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* **79**, 832-842 (2012).
68. O'rand, M. G., Widgren, E. E., Hamil, K. G., Silva, E. J. & Richardson, R. T. Epididymal Protein Targets: A Brief History of the Development of Epididymal Protease Inhibitor as a Contraceptive. *J. Androl.* **32**, 698-704 (2011).
69. O'Rand, M. G., Widgren, E. E., Wang, Z. & Richardson, R. T. Eppin: an epididymal protease inhibitor and a target for male contraception. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* **63**, 445-53 (2007).
70. Chen, Z. *et al.* A highly specific antibody response after protein prime-peptide boost immunization with Eppin/B-cell epitope in mice. *Hum. Vaccin.* **7**, 849-855 (2011).

71. Bandivdekar, A. H. Development of antifertility vaccine using sperm specific proteins. *Indian J. Med. Res.* **140 Suppl**, S73-7 (2014).
72. Chen, Z. *et al.* Nasal immunization using a mimovirus vaccine based on the Eppin B-cell epitope induced suppressed fertility in mice. *Hum. Vaccin. Immunother.* **10**, 2227-34 (2014).
73. Frank, K. M., Lyda, R. O. & Kirkpatrick, J. F. Immunocontraception of captive exotic species IV. Species differences in response to the porcine zona pellucida vaccine, timing of booster inoculations, and procedural failures. *Zoo Biol.* **24**, 349-358 (2005).
74. Joonè, C. J., Nolan, M. B., Bertschinger, H. J. & Schulman, M. L. Researching immunocontraceptive vaccines with mares (*Equus caballus*) as both a target and model for African elephant (*Loxodonta africana*) cows: A review. *Anim. Reprod. Sci.* **207**, 146-152 (2019).
75. Baker, D. L. *et al.* Reimmunization increases contraceptive effectiveness of gonadotropin-releasing hormone vaccine (GonaCon-Equine) in free-ranging horses (*Equus caballus*): Limitations and side effects. *PLoS One* **13**, e0201570 (2018).
76. Hobbs, N. T., Bowden, D. C. & Baker, D. L. Effects of Fertility Control on Populations of Ungulates: General, Stage-Structured Models. *J. Wildl. Manage.* **64**, 473 (2000).
77. Jöchle, W., Giménez, T., Esparza, H. & Hidalgo, M. A. Preparation of teaser bulls, rams and boars by penis and prepuce deviation. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* **68**, 395-400 (1973).
78. Welch Fossum, T. *et al.* *Cirugía en pequeños animales.* (2009).
79. Igboeli, G. & M. Rakha, A. Bull testicular and epididymal function after long-term vasectomy. 72-75 (1970).
80. Kumar, V. & Raj, A. Vasectomy in captive Sambar Stags (*Cervus unicolor*). *Int. J. Agro Vet. Med. Sci.* **5**, 397 (2011).
81. Crystal, R. *et al.* Assessing long-term changes in social well-being : case study of a vasectomized African waterbuck. 1-9 (2010).
82. Scully, C. M. *et al.* Comparison of Chemical and Surgical Vasectomy on Testicular Activity in Free-Roaming Horses (*Equus Caballus*) . *J. Zoo Wildl. Med.* **46**, 815-824 (2015).
83. Hart, B. L. & Jones, T. O. A. . Effects of castration on sexual behavior of tropical male goats. *Horm. Behav.* **6**, 247-258 (1975).

84. Nie, G. J., Johnson, K. E., Braden, T. D. & Wenzel, J. G. W. *Use of an intra-uterine glass ball protocol to extend luteal function in mares. Journal of equine veterinary science* (Elsevier Science, 2003).
85. Turin, E. M. *et al.* Effects of a copper-bearing intrauterine device on the ovarian function, body weight gain and pregnancy rate of nulliparous heifers. *Theriogenology* **47**, 1327-1336 (1997).
86. Galina Hidalgo, C. & Valencia, J. *Reproducción de animales domésticos*. (Limusa, 2008).
87. DeNicola, A. J., Kesler, D. J. & Swihart, R. K. Dose determination and efficacy of remotely delivered norgestomet implants on contraception of white-tailed deer. *Zoo Biol.* **16**, 31-37 (1997).
88. Jacobsen, N. K., Jessup, D. A. & Kesler, D. J. Contraception in Captive Black-Tailed Deer by Remotely Delivered Norgestomet Ballistic Implants. *Wildlife Society Bulletin (1973-2006)* **23**, 718-722 (1995).
89. White, L. M., Warren, R. J. & Fayrer-Hosken, R. A. LEVONORGESTREL IMPLANTS AS A CONTRACEPTIVE IN CAPTIVE WHITE-TAILED DEER. *J. Wildl. Dis.* **30**, 241-246 (1994).
90. Graham, L. H., Webster, T., Richards, M., Reid, K. & Joseph, S. Ovarian function in the Nile hippopotamus and the effects of Depo-Provera administration. *Reprod. Suppl.* **60**, 65-70 (2002).
91. Petta, C. A. *et al.* Timing of onset of contraceptive effectiveness in Depo-Provera users: Part I. Changes in cervical mucus. *FERTILITY AND STERILITY* **69**, (1998).
92. Kojima, F. N. *et al.* Development of an estrus synchronization protocol for beef cattle with short-term feeding of melengestrol acetate: 7-11 synch. *J. Anim. Sci.* **78**, 2186 (2000).
93. Raphael, B. L. *et al.* Use of melengestrol acetate in feed for contraception in herds of captive ungulates. *Zoo Biol.* **22**, 455-463 (2003).
94. Patton, M. L. *et al.* Aggression control in a bachelor herd of fringe-eared oryx (*Oryx gazella callotis*), with melengestrol acetate: Behavioral and endocrine observations. *Zoo Biol.* **20**, 375-388 (2001).
95. Patton, M. L. *et al.* SUCCESSFUL CONTRACEPTION IN A HERD OF CHINESE GORAL (*NEMORHAEDUS GORAL ARNOUXIANUS*) WITH MELENGESTROL ACETATE. [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2000\)031\[0228:SCIAHO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2000)031[0228:SCIAHO]2.0.CO;2) **31**, 228-230 (2000).

96. Wood, C. M., Kornegay, E. T. & Shipley, C. F. Efficacy of altrenogest in synchronizing estrus in two swine breeding programs and effects on subsequent reproductive performance of sows. *J. Anim. Sci.* **70**, 1357-1364 (1992).
97. Everaert, N. *et al.* Effects of post-weaning altrenogest treatment in primiparous sows. *VLAAMS Diergeneeskd. Tijdschr.* **76**, 293-299 (2007).
98. Shoemaker, C. F., Squires, E. L. & Shideler, R. K. Safety of altrenogest in pregnant mares and on health and development of offspring. *J. Equine Vet. Sci.* **9**, 69-72 (1989).
99. Mcneilly, A., Crawford, J., Taragnat, C. & Nicol, L. The differential secretion of FSH and LH: regulation through genes, feedback and packaging. (2003). doi:10.1530/biosciproc.5.034
100. Genazzani, A. D. *et al.* Long-term GnRH-agonist administration revealed a GnRH-independent mechanism stimulating FSH discharge in humans. *Eur. J. Endocrinol.* **134**, 77-83 (1996).
101. Patton, M. L. *et al.* Long-term suppression of fertility in female giraffe using the GnRH agonist deslorelin as a long-acting implant. *Theriogenology* **66**, 431-438 (2006).
102. CONNER, M. M. *et al.* Fertility Control in Free-Ranging Elk Using Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Leuprolide: Effects on Reproduction, Behavior, and Body Condition. *J. Wildl. Manage.* **71**, 2346 (2007).
103. Barrell, G. K., Schaafsma, S. C. T., Ridgway, M. J., Wellby, M. & Miller, L. A. Effects of a synthetic gonadotrophin-releasing hormone agonist, leuprolide, on rut-associated events in male red deer. *Anim. Prod. Sci.* **49**, 1120 (2009).
104. Baker, D. L. *et al.* Effects of GnRH agonist (leuprolide) on reproduction and behaviour in female wapiti (*Cervus elaphus nelsoni*). *Reprod. Suppl.* **60**, 155-67 (2002).
105. Maclellan, L. J. *et al.* Influence of the Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Agonist, Deslorelin, on Patterns of Estradiol-17P and Luteinizing Hormone Secretion, Ovarian Follicular Responses to Superstimulation with Follicle-Stimulating Hormone, and Recovery and In Vitro Devel. *Biol. Reprod.* **56**, 878-884 (1997).
106. Aspden, W. J. *et al.* Differential responses in anterior pituitary luteinizing hormone (LH) content and LH β - and α -subunit mRNA, and plasma concentrations of LH and testosterone, in bulls treated with the LH-releasing hormone agonist deslorelin. *Domest. Anim. Endocrinol.* **14**, 429-437 (1997).

107. D'Occhio, M. ., Fordyce, G., Whyte, T. ., Aspden, W. . & Trigg, T. . Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. *Anim. Reprod. Sci.* **60-61**, 433-442 (2000).
108. BRINSKO, S. P., SQUIRES, E. L., PICKETT, B. W. & NETT, T. M. Gonadal and Pituitary Responsiveness of Stallions is not Down-Regulated by Prolonged Pulsatile Administration of GnRH. *J. Androl.* **19**, 100-109 (1998).
109. Penfold, L. M. *et al.* Case studies in antelope aggression control using a GnRH agonist. *Zoo Biol.* **21**, 435-448 (2002).
110. Yurewicz, E. C., Sacco, A. G., Gupta, S. K., Xu, N. & Gage, D. A. *Hetero-oligomerization-dependent Binding of Pig Oocyte Zona Pellucida Glycoproteins ZPB and ZPC to Boar Sperm Membrane Vesicles**. (1998).

Anexo 1

En la siguiente tabla se muestra cual fue la estrategia de búsqueda para los artículos empleados en la revisión bibliográfica.

Tabla 3. Estrategia de búsqueda		
Base de datos	Estrategia	Resultados
SCOPUS	TITLE-ABS-KEY (immunocontraception AND wildlife)	124
	TITLE-ABS-KEY (immunocontraception AND "mechanism of action")	6
	TITLE-ABS-KEY (immunocontraception AND GnRH AND wildlife)	30
	TITLE-ABS-KEY (immunocontraception AND "porcine zona pellucida" AND wildlife)	42
	TITLE-ABS-KEY (immunocontraception AND ungulate* AND wildlife)	7

Anexo 2

Métodos anticonceptivos

Los métodos anticonceptivos usados en animales salvajes y en ungulados se pueden dividir en dos grandes grupos: reversibles y no reversibles. Estos segundos se basan en procesos quirúrgicos (castración, Ovariohisterectomía, vasectomía y métodos mecánicos). La mayoría de los métodos reversibles se basan en hormonas o en la inmunidad.

Los contraceptivos reversibles se pueden clasificar en tres grandes bloques: progestágenos, análogos de la hormona GnRH e immunocontracepción. Hay una pequeña parte de anticonceptivos, ahora cada vez más en desuso, que utilizan métodos físicos para impedir la concepción¹³.

Cirugía

Los procedimientos quirúrgicos son potencialmente irreversibles pero muy efectivos. Normalmente son métodos que se aplican en machos ya que la cirugía es más fácil y en hembras

se prefieren los métodos reversibles. Estudios han sugerido que la esterilización puede reducir la sobrepoblación⁷⁶.

En especies domésticas, se ha llevado a cabo la **translocación del pene** con éxito en vacas, ovejas, cabras y cerdos⁷⁷. Esta técnica previene el apareamiento, pero es inapropiada para animales salvajes que se exhiben en zoológicos.

Otra técnica quirúrgica para evitar la concepción es la **vasectomía**, consiste en realizar un corte en el cordón espermático para evitar que el eyaculado contenga esperma⁷⁸. Al juntar los machos vasectomizados con las hembras debemos tener en cuenta que si no se hace un lavado del conducto deferente pueden quedar espermatozoides y ser fértiles un tiempo post-cirugía⁷⁸. Hay estudios que demuestran que en toros no hay un cese de la espermatogénesis después de la vasectomía⁷⁹. El procedimiento ha resultado ser efectivo en diferentes especies de ungulados entre ellas: el Sambar (*Cervus unicolor*)⁸⁰, en el antílope acuático (*Kobus Ellipsiprymnus*)⁸¹, caballos salvajes (*Equus Caballus*)⁸². Una ventaja de la vasectomía es que no produce cambios del comportamiento ya que la producción de hormonas no se ve alterada en el procedimiento^{78,81}. Actualmente sólo la realizan especialistas, pero esta técnica tiene un futuro prometedor en especies unguladas¹³.

La **orquitectomía** es el procedimiento de extirpación quirúrgica de los testículos en machos⁷⁸. Esta cirugía es irreversible y requiere una completa inmovilización del macho mediante anestesia y sedación, pero es totalmente efectiva si se realiza bien el procedimiento. La mayor desventaja de la castración es el cambio en el comportamiento que sufren los animales debido a la alteración hormonal^{13,83}. La cirugía en hembras puede basarse en la retirada de los ovarios (**ovariectomía**) o del tracto reproductivo entero (**ovariohisterectomía; OHE**), también se puede hacer una **ligadura de trompas**¹³.

Las opciones quirúrgicas son irreversibles, pero altamente efectivas. Se debe tener en cuenta cuando esterilizamos a animales ungulados de exhibición, que normalmente se eliminan las características sexuales secundarias debido a la falta de testosterona (ej. Cérvidos con los cuernos) y que el comportamiento también se va a ver modificado, cómo la dominancia y la dinámica de los grupos¹³.

Métodos mecánicos

Los métodos mecánicos de contracepción consisten en la implantación de un objeto extraño en el útero, al que se llama **IUD** (dispositivos intrauterinos). Son técnicas muy antiguas

que han ido evolucionando a lo largo del tiempo pudiendo incluso llevar tratamientos hormonales incluidos. En un estudio llevado a cabo en yeguas se vio que al implantar una bola de cristal, en el útero el 40% de ellas, se extendió casi 90 días la función luteal⁸⁴. Otro estudio de 1997 demuestra un 98% de anestros en novillas nulíparas con IUDs y un 100% de contracepción. También se observó que, aunque se creía que la contracepción con IUDs era debido a la distensión de los cuernos uterinos, también bajó la progesterona en el plasma y se modificó la ovulación, por lo que se confirma las interrupciones tanto de la función esteroideogénica como de la gametogénica⁸⁵.

Para los machos también existen métodos mecánicos como **los tapones de silicona** del conducto deferente inyectables. La ventaja es que son muy efectivos y potencialmente reversibles, aunque la cirugía de implantación del tapón es tediosa y la reversibilidad del procedimiento se complica con el daño traumático que se causa en el conducto. También se ha observado que causan reacciones inflamatorias locales en el sitio de inyección de la silicona ya que hay exudado de esperma¹³.

Hormonales

Progestágenos

Los progestágenos son una serie de hormonas sintéticas que imitan la actividad de la progesterona (P4), aunque son más potentes y efectivas vía oral¹³.

La P4 es producida por las células del CL (cuerpo lúteo), aunque también es producida por la placenta en algunas especies. La actividad de la progesterona consiste en una retroalimentación negativa sobre las gonadotropinas y la GnRH, inhibiendo el desarrollo folicular (FSH) y la ovulación (LH). Otra función es la del mantenimiento de la gestación ya establecida, inhibe las contracciones uterinas, provoca el cierre del cérvix y estimula a las glándulas endometriales a secretar productos llamados leche uterina o histotrofo, sustancia que permite la nutrición del embrión antes de implantarse⁸⁶.

Se han hecho estudios en los que demuestran que los implantes de **Norgestomet** en venado de cola blanca y en venado de cola negra que demuestran que es un anticonceptivo altamente efectivo^{87,88}.

Por el contrario, el estudio de White et al., demuestra que el **Levonorgestrel** no es un progestágeno eficaz en cuanto a la contracepción en venado de cola blanca. En este estudio,

cinco de seis hembras de venado mostraron signos de celo y tres de estas cinco se quedaron gestantes⁸⁹.

Otro progestágeno es el **MPA** (Acetato de Medroxiprogesterona), inyectable y efectivo durante 1 ~ 3 meses. En un estudio con hipopótamos tratados con 0,8 g de MPA, se monitorizó la P4 fecal y las hembras volvieron a mostrar niveles pre-tratamiento a los 100 días (rango de 76-116d) post-tratamiento⁹⁰. Aunque el MPA actúe principalmente en el eje hipotálamo-pituitario-gonadal, tiene otras acciones contraceptivas como la alteración de la viscosidad del mucus cervical⁹¹, lo que afecta al transporte de espermatozoides. En otro estudio con 28 jirafas, a las cuales se les administró entre 0,15-1,2 g en intervalos de 1,5-3 meses durante 2-36 meses, se reportó tan solo una concepción cuando finalizó el tratamiento¹³. El MPA es una buena opción de contracepción en animales grandes ya que no se requiere anestesia para la aplicación del medicamento, aun así la dosificación en estas especies puede ser complicada¹³.

En situaciones de cautividad donde es relativamente fácil la captura de un animal, el **MGA** (Acetato de Melengestrol) ha resultado ser un efectivo método anticonceptivo en un número muy variado de especies, en las cuales, se les ha administrado un implante de silicona impregnado del progestágeno¹³. El MGA se puede administrar también vía oral en la alimentación. Estudios han demostrado que alimentando al ganado de carne con 5mg/kg y día, se suprime el estro y la ovulación⁹². También ha resultado ser efectivo en *Antilopa Cervicapra*, *Cervus duvauceli*, *Cervus axis*, *Cervus unicolor* y *Cervus nippon* en el Wildlife Conservation Society/Bronx Zoo (WCS/BZ). Donde la ingestión diaria estaba entre 1-2 mg por día. Se observó un 100% de contracepción en todos los animales menos en la especie de *Cervus axis* que el porcentaje fue de 94%. Se advirtió que los parámetros reproductivos post-tratamiento eran más bajos que los parámetros antes de tratar a los animales⁹³. Se ha usado el MGA para el control de la agresividad en órices de orejas francas (*Oryx gazella callotis*). La efectividad del tratamiento se relacionó con un declive en los niveles de andrógenos cuando los de MGA aumentaban⁹⁴. El MGA administrado en machos ha resultado ser inefectivo. Los niveles de testosterona, el comportamiento reproductor (reflejo de Flehmen), la circunferencia escrotal o la fertilidad no se ve afectada. Ocho hembras y cinco machos de goral chino (*Naemorhedus griseus*) fueron tratados con MGA en el alimento aproximadamente 0,8 mg/animal y día. En la temporada anterior de cría, seis de los ocho animales se quedaron gestantes (las dos restantes eran inmaduras). Durante la época en la que se aplicó el tratamiento, ningún animal tuvo descendencia. Una vez finalizado el tratamiento, seis ejemplares se quedaron gestantes. Los dos animales que no tuvieron descendencia fueron trasladados a otros centros. Se observó también que la alimentación con MGA no afectó a la maduración de una de las hembras jóvenes ni a los machos⁹⁵.

Otro progestágeno que se puede administrar vía oral es al **altrenogest**. Este medicamento se ha usado y vendido para suprimir o prevenir el estro y la ovulación en la yegua y la cerda⁹⁶⁻⁹⁸. Se han hecho estudios en yeguas donde demuestra que es un progestágeno seguro durante la gestación⁹⁸.

Los progestágenos son más efectivos que la progesterona y se pueden administrar oralmente. Suprimen la actividad estral y la función luteal. Son efectivos y seguros en un rango muy amplio de especies de mamíferos.

Agonistas de la GnRH

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), es una hormona hipotalámica que regula la reproducción. Es la encargada de la liberación de hormona luteinizante (LH) y de la hormona foliculoestimulante (FSH), cuya tarea es la ovulación y el crecimiento de folículos, respectivamente¹⁴.

Un tratamiento a largo plazo con agonistas de GnRH previene la ovulación, disminuyendo los receptores de la hormona en la glándula pituitaria, impidiendo así, que se libere la cantidad necesaria de FSH y LH para el funcionamiento del ovario¹⁵. Aunque hay estudios, que sugieren que la FSH no sólo se estimula con la GnRH sino que también se usa una vía alternativa para la liberación de esta hormona^{99,100}. Por esta razón, el control de la FSH es menos estricto que el de la LH.

Se ha comprobado la efectividad del tratamiento con GnRH en diversos estudios. Se administró una dosis de GnRH sintético de liberación lenta a 13 hembras de ciervo mulo (*Odocoileus hemionus*) y se demostró que el método ofrecía una alternativa reversible y altamente eficaz en la hembra de ciervo¹⁵.

Otro estudio realizado en dos jirafas hembras tratadas con un implante subcutáneo (SC) de la hormona, resultó suprimir el estro en ambas hembras, aunque con efectos diferentes¹⁰¹.

34 hembras de ciervo común (*Cervus elaphus*) fueron sometidas a un estudio. 17 hembras fueron tratadas, con una inyección SC, y 17 se dejaron sin tratar. Se observó que en la época de cría las hubo un 0% de tasa de gestación en el primer grupo mientras que en el grupo control se vio un 79% de gestación. Al final del estudio se pudo observar que el tratamiento fue reversible en todas las hembras¹⁰².

También se ha demostrado la eficacia del método en machos ciervo (*Cervus elaphus*) dónde se vio en 20 machos, la mitad tratados con baja dosis y la otra mitad con dosis altas, que tanto la testosterona como a agresividad disminuían, llegando a la conclusión de que el GnRH sintético es un método efectivo para disminuir los efectos no deseados de celo¹⁰³. 8 hembras de Wapiti fueron tratadas con un implante subcutáneo de agonista de GnRH que resultó ser efectivo en todas ellas¹⁰⁴. A diferencia de los datos recopilados de la mayoría de los otros órdenes, familias y especies la evidencia sugiere que los análogos de GnRH probablemente sean ineficaces como anticonceptivos para los ungulados masculinos¹³. Las respuestas divergentes en el eje endocrino-reproductivo en los machos pueden ser el resultado de los efectos diferenciales de los agonistas de la GnRH en la función pituitaria-gonadal entre especies, lo que puede ocurrir tanto en machos como en hembras¹⁰⁵. Varios estudios han demostrado que el tratamiento con agonistas de GnRH no logra regular suficientemente la LH y la testosterona séricas para inhibir la espermatogénesis en el toro^{106,107}, semental¹⁰⁸ y especies de antílopes¹⁰⁹.

Inmuncontracepción

La inmuncontracepción es un método que utiliza los anticuerpos creados contra la zona Pelúcida o contra los receptores de GnRH para evitar la concepción.

Estos Ac se crean a partir de antígenos administrados con una vacuna. Uno de los mejores métodos de inmuncontracepción es la vacuna de **zona pelúcida porcina (PZP)**. El óvulo de todos los mamíferos esta rodeado por una membrana no celular conocida como zona pelúcida (ZP). La ZP consiste en diversas glicoproteínas (ZP1, ZP2, ZP3 α y ZP3 β). En el cerdo, las glicoproteínas ZP3 α y ZP3 β , juegan un papel importante en el acoplamiento del espermatozoides al óvulo¹¹⁰. El antígeno de PZP viene de el óvulo porcino y es inyectado intramuscularmente en las hembras. El sistema inmune de los animales se estimula y produce anticuerpos contra el antígeno que se unen a los receptores de espermatozoides del propio óvulo, impidiendo así la fertilización¹⁶. Primero se administra una inyección “primaria”, seguida por una o dos inyecciones de recordatorio en un intervalo de 2-3 semanas, dependiendo del adyuvante usado¹⁸. La vacuna se puede administrar por inyección manual o vía dardo. Esta vacuna se ha usado en un gran amplio número de especies de ungulados como: el bisonte norte americano (*Bison bison*), tahr himalayo (*H. jemlahicus*), ciervo sambar (*C. unicolor*), kudu (*Taurotragus strepsiceros*), ciervo de Sika (*C. nippon taiouanus and mandarinus*), wapiti (*C. elaphus*), reno (*Rangifer tarandus*), bongo (*Taurotragus euryceros*), markhor (*Capra falconeri*), carnero de las rocosas (*O. canadensis*), cabras de las rocosas (*Oreamnos americanus*), jirafa (*Giraffa camelopardalis*), cebra (*Equus zebra*, todas las subespecies), and íbex (*Capra*

capra)^{17,18}. En estos estudios, los animales recibieron tres tipos de tratamiento diferentes, la eficacia de los cuales estuvo entre un 80-100%. Estos diferentes tratamientos vienen dados por la diferencia en la respuesta inmune de cada especie. Después de una serie de tres inoculaciones a un tahr himalayo, los títulos de anticuerpos se encontraban entre un 94-100%, mientras que en el muntíaco de Reeves se produjeron tan solo entre un 19-28% de anticuerpos, con el mismo tratamiento¹⁷. La mayor causa de fracaso en la contracepción, con la vacuna PZP, es debido a la mala administración de las inyecciones en un correcto intervalo de tiempo. En jirafas, la eficacia contraceptiva es de ~ 95%, cuando se tienen en cuenta los fallos técnicos. En cebras, hubo un solo fallo biológico, entre los 30 animales tratados, de los cuales tres se quedaron gestantes, por no administrar según la prescripción. Tres de 18 bisontes se quedaron gestantes después de una inoculación inicial y no se llegó a completar las tres inoculaciones antes de juntar hembras y machos¹⁶.

La inmunización contra la GnRH (**anti-GnRH**), causa una interrupción de la ovulación y el desarrollo folicular en hembras, y ha resultado efectivo en un amplio rango de ungulados, como en hembras y machos de venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*)¹⁹⁻²¹, hembras de bison americano (*Bison bison*)²², machos y hembras de jabalí (*Sus scrofa*)²³, en caballo salvaje (*Equus caballus*)²⁴⁻²⁶. Ninguno de los métodos basados en la inmunidad es 100% efectivo debido a la variación individual de la inmunocompetencia.

Las desventajas de la inmun contracepción incluyen el potencial problema asociado a la apropiada administración que puede resultar en gestaciones y la esterilidad con un tratamiento muy prolongado o en especies susceptibles⁶². La obtención de reacciones cruzadas con la prueba de la TB se ha solucionado cambiando el adyuvante⁴. Se debe tener en cuenta que ningún método es 100% efectivo debido a la variación individual en la inmunocompetencia. El único efecto adverso descrito más frecuentemente es el de reacciones en el lugar de inoculación que puede ir de abscesos (adyuvante CFA) a pequeños granulomas (adyuvante MFA) o una simple inflamación en el lugar de inoculación^{4,63,64}. Pese a esto último, los efectos secundarios parecen ser raros y sin mayor importancia⁴. La administración de las vacunas durante la gestación no la interrumpen ni influyen en la salud de la descendencia⁴⁶. La inmun contracepción es una herramienta anticonceptiva con un gran número de ventajas, con una sola inyección puedes causar una infertilidad prolongada en ambos sexos, la efectividad es muy elevada y su coste muy asequible. Aunque faltan estudios que investiguen los efectos de la vacuna a largo plazo no hay indicios de que pueda tener consecuencias a largo plazo ni impacto en caracteres sexuales secundarios.